



①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 195 08 923 A 1**

⑳ Aktenzeichen: 195 08 923.5  
㉔ Anmeldetag: 13. 3. 95  
㉕ Offenlegungstag: 19. 9. 96

⑤1 Int. Cl.<sup>8</sup>:  
**C 07 H 21/00**  
C 07 H 1/00  
C 07 F 9/6506  
A 61 K 31/70  
// C 07 F 9/38, 9/6561,  
C 12 N 7/06

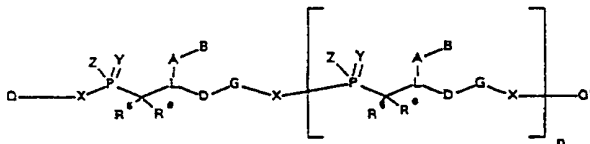
DE 195 08 923 A 1

㉑ Anmelder:  
Hoechst AG, 65929 Frankfurt, DE

㉒ Erfinder:  
Anuschirwan, Peyman, Dr., 65779 Kelkheim, DE;  
Uhlmann, Eugen, Dr., 61479 Glashütten, DE;  
Breipohl, Gerhard, Dr., 60529 Frankfurt, DE;  
Wallmeier, Holger, Dr., 65843 Suizbach, DE

⑤4 Phosphonomonoesternukleinsäuren, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung

⑤7 Verbindungen der Formel I



mit den in Anspruch 1 angegebenen Definitionen finden als Inhibitoren der Genexpression Verwendung. Darüber hinaus werden sie als Diagnostikum, beispielsweise zur Detektion der Präsenz oder Absenz oder der Menge eines spezifischen doppelsträngigen oder einzelsträngigen Nucleinsäuremoleküls in einer biologischen Probe verwendet.

DE 195 08 923 A 1

## Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft neue Oligonucleotidanaloga mit wertvollen physikalischen, biologischen und pharmakologischen Eigenschaften sowie ein Verfahren zu deren Herstellung. Ihre Anwendung bezieht sich auf die Verwendung als Inhibitoren der Genexpression (Antisense Oligonucleotide, Ribozyme, Sense Oligonucleotide und Triplex Forming Oligonucleotide), als Sonden zum Nachweis von Nucleinsäuren und als Hilfsmittel in der Molekularbiologie.

Oligonucleotide finden in wachsendem Maße Anwendung als Inhibitoren der Genexpression (J. F. Milligan, M. D. Matteucci und J. C. Martin, *J. Med. Chem.* 36 (1993) 1923; E. Uhlmann and A. Peyman, *Chemical Reviews* 90 (1990) 543; S. T. Crooke, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32 (1992) 329).

Antisense Oligonucleotide sind Nucleinsäure-Fragmente, deren Basensequenz komplementär ist zu einer zu inhibierenden mRNA. Diese Target-mRNA kann zellulären, viralen oder sonstigen pathogenen Ursprungs sein. Als zelluläre Target-Sequenzen kommen beispielsweise die von Rezeptoren, Enzymen, Wachstumsfaktoren, Immunmodulatoren, Ionenkanälen oder Onkogenen in Frage. Die Inhibition der Virus Vermehrung mit Hilfe von Antisense Oligonucleotiden wurde beispielsweise für RSV (Rous Sarcoma Virus), HSV-1 und -2 (Herpes Simplex Virus Typ I und II), HIV (Human Immunodeficiency Virus) und Influenza-Viren beschrieben. Dabei setzt man Oligonucleotide ein, die zur viralen Nucleinsäure komplementär sind.

Sense Oligonucleotide sind dagegen in ihrer Sequenz so konzipiert, daß sie beispielsweise Nucleinsäure-bindende Proteine oder Nucleinsäure-prozessierende Enzyme binden ("einfangen") und so deren biologische Aktivität inhibieren (C. Hélène and J. J. Toulmé, *Biochim. Biophys. Acta* 1049 (1990) 99). Als virale Targets sind hier beispielsweise die Reverse Transkriptase, DNA-Polymerase und Transaktivator-Proteine zu nennen. Triplex Forming Oligonucleotide haben im allgemeinen die DNA als Target und bilden nach Bindung an diese eine tripelhelicale Struktur aus.

Während mit Hilfe der Antisense Oligonucleotide im allgemeinen die Prozessierung (Splicing etc.) der mRNA oder deren Translation in das Protein gehemmt werden, hemmen Triplex Forming Oligonucleotide die Transkription oder Replikation der DNA (N. T. Thuong, und C. Hélène, *Angew. Chem.* 105 (1993) 697; Uhlmann und Peyman, *Chemical Reviews* 90 (1990) 543). Es ist aber auch möglich, einzelsträngige Nucleinsäuren in einer ersten Hybridisierung mit einem Antisense Oligonucleotid unter Ausbildung eines Doppelstranges zu binden, der dann in einer zweiten Hybridisierung mit einem Triplex Forming Oligonucleotid eine Triplex-Struktur ausbildet. Die Antisense und Triplex Bindungsregionen können dabei entweder in zwei separaten Oligonucleotiden oder aber in einem Oligonucleotid beherbergt sein.

Eine weitere Anwendung synthetischer Oligonucleotide sind die sogenannten Ribozyme, welche die Target-RNA infolge ihrer Ribonuclease-Aktivität zerstören (D. Castanotto, J. J. Rossi, J. O. Deshler, *Critical Rev. Eukar. Gene Expr.* 2 (1992) 331).

In der DNA-Diagnostik werden Nucleinsäure-Fragmente mit geeigneter Markierung als sogenannte DNA-Sonden oder DNA-Proben für die spezifische Hybridisierung an eine nachzuweisende Nucleinsäure eingesetzt. Die spezifische Ausbildung des neuen Doppelstranges wird dabei mit Hilfe der Markierung, die vorzugsweise nicht radioaktiv ist, verfolgt. Auf diese Weise lassen sich genetische, maligne, virale oder durch andere Pathogene verursachte Krankheiten nachweisen.

Für die meisten genannten Anwendungen sind Oligonucleotide in ihrer natürlich vorkommenden Form wenig oder völlig ungeeignet. Sie müssen chemisch so modifiziert werden, daß sie den speziellen Anforderungen gerecht werden. Damit Oligonucleotide in biologischen Systemen, beispielsweise zur Inhibition der Virus-Vermehrung eingesetzt werden können, müssen sie folgende Voraussetzungen erfüllen:

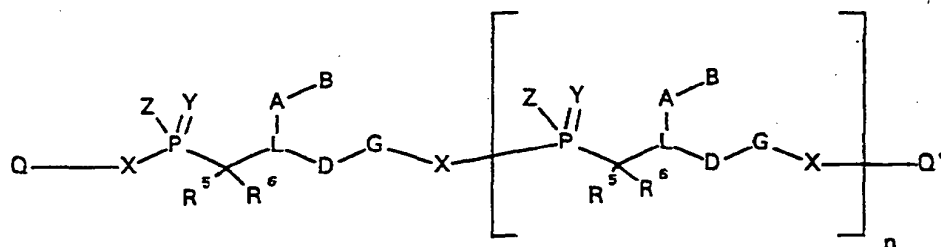
1. Sie müssen unter in vivo Bedingungen, also sowohl im Serum als auch intrazellulär, eine ausreichend große Stabilität aufweisen.
2. Sie müssen so beschaffen sein, daß sie die Zell- und Nucleus-Membran passieren können.
3. Sie müssen unter physiologischen Bedingungen in Basen-spezifischer Weise an ihre Target-Nucleinsäure binden, um den inhibitorischen Effekt zu entfalten.

Für DNA-Sonden sind diese Voraussetzungen nicht unabdingbar; jedoch müssen diese Oligonucleotide so derivatisiert sein, daß ein Nachweis, beispielsweise mittels Fluoreszenz, Chemilumineszenz, Kolorimetrie oder spezifischer Färbung, möglich ist (Beck und Köster, *Anal. Chem.* 62 (1990) 2258).

Es sind eine Vielzahl chemischer Variationen von Oligonucleotiden bekannt, die synthetisiert wurden mit dem Ziel, die oben genannten Anforderungen besser zu erfüllen als die nicht modifizierten Oligonucleotide. Die chemische Veränderung der Oligonucleotide erfolgt meistens in der Weise, daß Phosphatrückgrat, Ribose-Einheit oder die Nucleobasen entsprechend verändert werden (Uhlmann und Peyman, *Chemical Review* 90 (1990) 543). Unter den Modifikationen finden sich auch solche, in denen sowohl die Phosphat-Brücke, wie auch die Zuckereinheit durch andere Gruppierungen ersetzt wurden, beispielsweise durch "Morpholinonucleosid"-Oligomere (E. P. Stirchak et al., *Nucleic Acids Res.* 17 (1989) 6129) oder "PNAs" (P. E. Nielsen et al., *Bioconj. Chem.* 5 (1994) 3). Insbesondere PNA's zeichnen sich durch ungewöhnlich hohe Affinitäten zur Target-RNA aus, leiden aber an anderen ungünstigen Eigenschaften wie mangelnde Löslichkeit oder mangelnde Zellpenetration (W. Wang et al., *Tetrahedron Letters* 36 (1995) 1181; M. Egholm et al., in "Innovation and Perspectives in Solid Phase Synthesis, Peptides, Proteins, Nucleic Acids", Roger Epton, Ed. Mayflower Worldwide Limited, Birmingham, 1994, 145—148).

Aufgabe ist es daher, neue Oligonucleotid-Analoga zu finden, die den oben genannten Anforderungen besser entsprechen.

Gegenstand der Erfindung sind daher Verbindungen der Formel I



(I)

worin n eine Zahl von Null bis 100 bedeutet;

B unabhängig voneinander Wasserstoff, Hydroxy, (C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>)-Alkyl, (C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>)-Alkoxy, (C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>)-Alkylthio, (C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>)-Aryl, (C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>)-Aryl-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alkyl, (C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>)-Aryl-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alkoxy, (C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>)-Aryl-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alkylthio, eine aromatische Gruppe oder eine heterocyclische Gruppe bedeutet, wobei Alkyl, Aryl und/oder die aromatische oder heterocyclische Gruppe gegebenenfalls ein oder mehrfach durch Hydroxy, (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-Alkoxy, -NR<sup>9</sup>R<sup>10</sup>, -C(O)OH, Oxo, -C(O)OR<sup>8</sup>, -C(O)NR<sup>9</sup>R<sup>10</sup>, -CN, -F, -Cl, -Br, -NO<sub>2</sub>, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkoxyalkyl, -S(O)<sub>m</sub>R<sup>8</sup>, -(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkyl-S(O)<sub>m</sub>R<sup>8</sup>, -NHC(=NH)NHR<sup>8</sup>, -C(=NH)NHR<sup>8</sup>, -NR<sup>9</sup>C(=O)R<sup>8</sup>, =NOR<sup>8</sup>, NR<sup>9</sup>C(=O)OR<sup>10</sup>, -OC(=O)NR<sup>9</sup>R<sup>10</sup> und -NR<sup>9</sup>C(=O)NR<sup>9</sup>R<sup>10</sup> substituiert sein können, oder

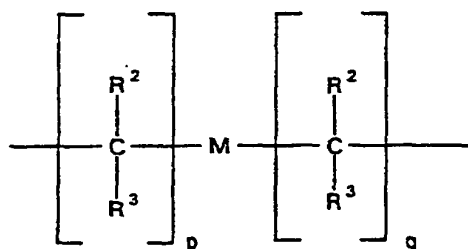
B für eine natürliche Nucleobase, eine unnatürliche Nucleobase oder einen Reporter Liganden steht;

A-B kann auch für eine über die Carboxylgruppe aufkondensierte D- oder L-Aminosäure oder für Peptide bestehend aus diesen Aminosäuren mit bis zu einer Länge von 5 Aminosäureresten stehen,

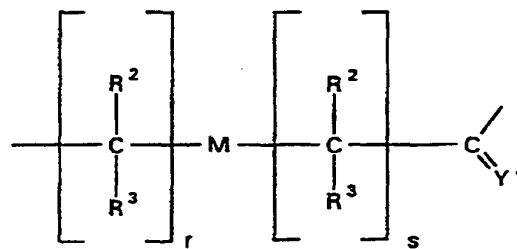
L unabhängig voneinander N oder R<sup>1</sup>N<sup>+</sup>, und

R<sup>1</sup> für Wasserstoff oder (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkyl steht, das mit Hydroxy, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkoxy, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkylthio oder Amino substituiert sein kann, bevorzugt Wasserstoff oder Methyl bedeutet;

A unabhängig voneinander eine Einfachbindung, eine Methylengruppe oder eine Gruppe der Formel IIa oder IIb bedeutet;



(IIa)



(IIb)

Y' für =O, =S, =CH<sub>2</sub>, =C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> oder =N<sup>+</sup>R<sup>1</sup> steht, wobei R<sup>1</sup> wie oben definiert ist;

M für eine Einfachbindung, -O-, -S- oder -N<sup>+</sup>R<sup>1</sup>- steht, wobei R<sup>1</sup> wie oben definiert ist;

R<sup>2</sup> und R<sup>3</sup> unabhängig voneinander für Wasserstoff, Hydroxy, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkoxy, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkylthio, Amino, Halogen, wie F, Cl, Br oder (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkyl steht, welches gegebenenfalls mit Hydroxy, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkoxy oder (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkylthio substituiert sein kann, bevorzugt jedoch Wasserstoff bedeutet;

p und q unabhängig voneinander für Null bis 5 stehen;

r und s unabhängig voneinander für Null bis 5 stehen;

D und G für CR<sup>5</sup>R<sup>6</sup> stehen;

R<sup>5</sup> und R<sup>6</sup> unabhängig voneinander Wasserstoff, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkyl, (C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>)-Aryl, (C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>)-Aryl-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alkyl, Hydroxy, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkoxy, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkylthio bedeuten, und Alkyl und Aryl gegebenenfalls mit SR<sup>1</sup> oder NR<sup>1</sup>R<sup>1'</sup> substituiert sein kann, wobei R<sup>1</sup> wie oben definiert ist und R<sup>1'</sup> unabhängig von R<sup>1</sup> die gleiche Bedeutung wie R<sup>1</sup> hat, R<sup>5</sup> und R<sup>6</sup> jedoch bevorzugt Wasserstoff bedeutet;

X für -O-, -S- oder -N<sup>+</sup>R<sup>1</sup>-, worin R<sup>1</sup> wie oben definiert ist, steht;

Y für =O oder =S steht;

Z für -OR<sup>8</sup>, -NR<sup>9</sup>R<sup>10</sup> steht;

R<sup>8</sup> Wasserstoff, (C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>)-Alkyl, (C<sub>2</sub>-C<sub>18</sub>)-Alkenyl, (C<sub>3</sub>-C<sub>18</sub>)-Alkynyl, (C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>)-Aryl, (C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>)-Aryl-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alkyl bedeutet, wobei Alkyl ein oder mehrfach mit Hydroxy, (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-Alkoxy, F, Cl, Br substituiert sein kann und Aryl 1-3fach mit Hydroxy, (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-Alkoxy, (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-Alkyl, F, Cl, Br, NO<sub>2</sub>, -NR<sup>9</sup>R<sup>10</sup>, -C(O)OH, -C(O)O-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkyl, -C(O)NR<sup>9</sup>R<sup>10</sup>, substituiert sein kann, bevorzugt jedoch für Wasserstoff, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkyl, (C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>)-Aryl oder (C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>)-Aryl-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alkyl steht, wobei Aryl einfach mit (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-Alkoxy, (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-Alkyl, F, Cl, Br, NO<sub>2</sub>, substituiert sein kann, besonders bevorzugt Wasserstoff, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkyl, Phenyl oder 2-(4-Nitrophenyl)ethyl bedeutet;

R<sup>9</sup> und R<sup>10</sup> unabhängig voneinander für Wasserstoff, (C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>)-Alkyl, (C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>)-Alkenyl, (C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>)-Alkynyl,

(C<sub>6</sub>—C<sub>12</sub>)-Aryl, (C<sub>6</sub>—C<sub>12</sub>)-Aryl-(C<sub>1</sub>—C<sub>6</sub>)-alkyl stehen, wobei Alkyl ein oder mehrfach mit Hydroxy, (C<sub>1</sub>—C<sub>4</sub>)-Alkoxy, F, Cl, Br substituiert sein kann, oder R<sup>9</sup> und R<sup>10</sup> können zusammen mit dem sie tragenden N-Atom einen 4—7 gliedrigen Ring bilden;

- Q und Q' unabhängig voneinander Wasserstoff bedeuten, für Konjugate stehen, welche die Eigenschaften von Antisense-Oligonucleotiden oder von Tripelhelix bildenden Oligonucleotiden günstig beeinflussen oder als Markierung einer DNA Sonde dienen oder bei der Hybridisierung des Oligonucleotidanalogons an die Target-Nucleinsäure diese unter Bindung oder Quervernetzung angreift, oder Oligonucleotide bedeuten, die unmodifiziert oder modifiziert sein können, wobei folgende Varianten beispielhaft für einige Modifikationen stehen sollen (z. B. beschrieben in E. Uhlmann and A. Peyman, Chemical Reviews 90 (1990) 543; "Protocols for Oligonucleotides and Analogs", Synthesis and Properties & Synthesis and Analytical Techniques, S. Agrawal, Ed, Humana Press, Totowa, USA 1993):

- a) vollständiger oder teilweiser Ersatz der 3'- und/oder der 5'-Phosphorsäurediesterbrücken, beispielsweise durch Phosphorothioat-, Phosphorodithioat-, NR<sup>4</sup>R<sup>4'</sup>-Phosphoramidat-, Boranophosphat-, Phosphat-(C<sub>1</sub>—C<sub>21</sub>)-O-Alkylester, Phosphat-[(C<sub>6</sub>—C<sub>12</sub>)Aryl-(C<sub>1</sub>—C<sub>21</sub>)-O-Alkyl]ester, 2,2,2-Trichlorodimethylethylphosphonat-, (C<sub>1</sub>—C<sub>8</sub>)-Alkylphosphonat- oder (C<sub>6</sub>—C<sub>12</sub>)-Arylphosphonat-Brücken, wobei R<sup>4</sup> und R<sup>4'</sup> unabhängig voneinander für Wasserstoff, (C<sub>1</sub>—C<sub>18</sub>)-Alkyl, (C<sub>6</sub>—C<sub>20</sub>)-Aryl, (C<sub>6</sub>—C<sub>14</sub>)-Aryl-(C<sub>1</sub>—C<sub>8</sub>)-alkyl oder —(CH<sub>2</sub>)<sub>c</sub>—[NH(CH<sub>2</sub>)<sub>c</sub>]<sub>d</sub>—NR<sup>7</sup>R<sup>7'</sup> steht, worin c eine ganze Zahl von 2 bis 6 und d eine ganze Zahl von 0 bis 6 ist, und R<sup>7</sup> unabhängig voneinander Wasserstoff, (C<sub>1</sub>—C<sub>6</sub>)-Alkyl oder (C<sub>1</sub>—C<sub>4</sub>)-Alkoxy-(C<sub>1</sub>—C<sub>6</sub>)-alkyl ist, bevorzugt R<sup>4</sup> und R<sup>4'</sup> für Wasserstoff, (C<sub>1</sub>—C<sub>8</sub>)-Alkyl oder Methoxyethyl, besonders bevorzugt für Wasserstoff, (C<sub>1</sub>—C<sub>4</sub>)-Alkyl oder Methoxyethyl steht oder R<sup>4</sup> und R<sup>4'</sup> können auch zusammen mit dem sie tragenden Stickstoffatom einen 5—6 gliedrigen heterocyclischen Ring bilden, der zusätzlich ein weiteres Heteroatom aus der Reihe O, S, N enthalten kann;
- b) vollständiger oder teilweiser Ersatz der 3'- oder 5'-Phosphorsäurediesterbrücken durch "Dephospho"-Brücken (s. z. B. Uhlmann und Peyman in "Methods in Molecular Biology", Vol. 20, "Protocols for Oligonucleotides and Analogs", S. Agrawal, Ed, Humana Press, Totowa 1993, Chapter 16, 355ff), beispielsweise durch Formacetal, 3'-Thioformacetal, Methylhydroxylamin, Oxim, Methylendimethylhydrazo, Dimethylensulfon oder Silylgruppen;
- c) vollständiger oder teilweiser Ersatz des Zuckerphosphat-Rückgrats, beispielsweise durch "Morpholinonucleosid"-Oligomere (E. P. Stirchak et al., Nucleic Acids Res. 17 (1989) 6129) oder "PNAs" (P. E. Nielsen et al., Bioconj. Chem. 5 (1994) 3), oder PNA—DNA-Hybride wie beispielsweise in DE-P 44 08 528.1 (HOE 94/F 057) beschrieben;
- d) vollständiger oder teilweiser Ersatz der β-D-2'-Desoxyriboseeinheiten, beispielsweise durch -D-2'-Desoxyribose, L-2'-Desoxyribose, 2'-F-2'-Desoxyribose, 2'-O-(C<sub>1</sub>—C<sub>6</sub>)Alkyl-Ribose, 2'-O-(C<sub>2</sub>—C<sub>6</sub>)Alkenyl-Ribose, 2'-NH<sub>2</sub>-2'-desoxyribose, β-D-Xylofuranose, -Arabinofuranose, 2,4-Dideoxy-β-D-erythrohexo-pyranose, und carbocyclische (z. B. Froehler, J. Am. Chem. Soc. 114 (1992) 8320) und offenkettige Zuckeranaloga (z. B. Vandendriessche et al., Tetrahedron 49 (1993) 7223) oder Bicyclo-Zuckeranaloga (z. B. M. Tarkov et al., Helv. Chim. Acta 76 (1993) 481);
- e) vollständiger oder teilweiser Ersatz der natürlichen Nucleosid-Basen, beispielsweise durch 5-(Hydroxymethyl)uracil, 5-Aminouracil, Pseudouracil, Dihydrouracil, 5-(C<sub>1</sub>—C<sub>6</sub>)-Alkyl-uracil, 5-(C<sub>2</sub>—C<sub>6</sub>)-Alkenyl-uracil, 5-(C<sub>2</sub>—C<sub>6</sub>)-Alkyluracil, 5-(C<sub>1</sub>—C<sub>6</sub>)-Alkyl-cytosin, 5-(C<sub>2</sub>—C<sub>6</sub>)-Alkenyl-cytosin, 5-(C<sub>2</sub>—C<sub>6</sub>)-Alkylcytosin, 5-Fluoruracil, 5-Fluorcytosin, 5-Chloruracil, 5-Chlorcytosin, 5-Bromuracil, 5-Bromcytosin oder 7-Deaza-7-substituierte Purine.

- Q und Q' können auch für Konjugate stehen, welche die Eigenschaften von Antisense-Oligonucleotiden oder von Tripelhelix bildenden Oligonucleotiden (wie beispielsweise Zellpenetration, Nucleaseabbau, Affinität zur Target-RNA/DNA, Pharmakokinetik) günstig beeinflussen oder als Markierung einer DNA Sonde dienen oder bei der Hybridisierung des Oligonucleotidanalogons an die Target-Nucleinsäure diese unter Bindung oder Quervernetzung angreift. Beispiele dafür sind Konjugate mit Poly-Lysin, mit Interkalatoren wie Pyren, Acridin, Phenazin, Phenanthridin, mit fluoreszierenden Verbindungen wie Fluorescein, mit Cross-Linkern wie Psoralen, Azidoproflavin, mit lipophilen Molekülen wie (C<sub>12</sub>—C<sub>20</sub>)-Alkyl, mit Lipiden wie 1,2-Di-hexadecyl-rac-glycerin, mit Steroiden wie Cholesterin oder Testosteron, mit Vitaminen wie Vitamin E, mit Poly- bzw. Oligo-ethylenglycol, mit (C<sub>12</sub>—C<sub>18</sub>)-Alkyl-Phosphatdiestern, mit —O—CH<sub>2</sub>—CH(OH)—O—(C<sub>12</sub>—C<sub>18</sub>)-Alkyl. Bevorzugt sind Konjugate mit lipophilen Molekülen wie (C<sub>12</sub>—C<sub>20</sub>)-Alkyl, mit Steroiden wie Cholesterin oder Testosteron, mit Poly- oder Oligoethylenglykol, mit Vitamin E, mit Interkalatoren wie Pyren, mit (C<sub>14</sub>—C<sub>18</sub>)-Alkyl-Phosphatdiestern, mit —O—CH<sub>2</sub>—CH(OH)—O—(C<sub>12</sub>—C<sub>18</sub>)-Alkyl. Die Darstellung solcher Oligonucleotid-Konjugate ist dem Fachmann bekannt (s. z. B. Uhlmann & Peyman, Chem. Rev. 90 (1990) 543; M. Manoharan in "Antisense Research and Applications", Crooke and Lebleu, Eds, CRC Press, Boca Raton, 1993, Chapter 17, S. 303ff. und EP-A 0 552 766). Weiterhin können die Oligonucleotide am 3' oder am 5'-Ende 3'-3'- und 5'-5'-Inversionen (beschrieben beispielsweise in M. Koga et al., J. Org. Chem. 56 (1991) 3757) tragen.

Aromatische Gruppen sind beispielsweise Phenyl, Naphthyl, Pyrenyl, Anthracenyl, Phenanthryl, Biphenyl, Binaphthyl, Tetracenyl, Pentacenyl, Hexacenyl, Triphenylenyl, Chrysenyl oder Benzopyrenyl.

- Unter heterocyclische Gruppen sind beispielsweise Chromanyl, Chrom nylum-1-yl, Furanyl, Isochromanyl, Isochromenyl, Isoquinolyl, Piperazinyl, Quinoliny, Pyridinyl, Pyrrolidinyl, Imidazyl, Tetrahydrofuranly, Aziranyl, Oxiranyl, Thiophenyl, Pyrimidinyl, Thielanyl, Thiazolyl, Azepinyl, Pyrrolyl, Tetrahydropyrrolyl, Benzofuranly, Indolyl, Isoindolyl, Isatiny, Dioxindolyl, Indoxyl, Coumarinyl, Coumaronyl, Carbazolyl, Pyrazolyl, Pyrrolyl, Indazolyl, Oxazolyl, Isoxazolyl, Thiazolyl, 1,2,4-Triazolyl, 1,2,3-Triazolyl, Tetrazolyl, Pentazolyl, Piperidinyl, Pyridiziny, Phenazinyl, Phenoxazinyl, Phenothiazinyl, Morpholinyl, Thiazinyl, Benzodiazepinyl, Purinyl, Xanthinyl,

Hypoxanthinyl, Theophyllinyl, Theobrominyl, Coffeinyl, Pteridinyl, Pterinyl, Pteridinyl, Alloxazinyl und Nortropinyl zu verstehen.

Unter natürlichen Nucleobasen werden z. B. Uracil, Cytosin, 5-Methyluracil, Adenin und Guanin und unter unnatürliche Nucleobasen werden z. B. 5-Nitroindol, 5-(Hydroxymethyl)-uracil, 5-Aminouracil, Pseudouracil, Dihydrouracil, 5-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkyl-uracil, 5-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkenyl-uracil, 5-(C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkynyluracil, 5-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkyl-cytosin, 5-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkenyl-cytosin, 5-(C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkynyl-cytosin, 5-Fluoruracil, 5-Fluorcytosin, 5-Chloruracil, 5-Chlorcytosin, 5-Bromuracil, 5-Bromcytosin und 7-Deaza-7-substituierte Purine, wie 7-Deaza-7-(C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>)-alkinylguanin, 7-Deaza-7-(C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>)-alkinyladenin, 7-Deaza-7-(C<sub>2</sub>-C<sub>7</sub>)-alkenylguanin, 7-Deaza-7-(C<sub>2</sub>-C<sub>7</sub>)-alkenyladenin, 7-Deaza-7-(C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>)-alkylguanin, 7-Deaza-7-(C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>)-alkyladenin, 7-Deaza-7-bromguanin und 7-Deaza-7-bromadenin verstanden.

Bevorzugt stehen unnatürliche Nucleobasen für 5-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkyl-uracil, 5-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkenyl-uracil, 5-(C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkynyl-uracil, 5-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkyl-cytosin, 5-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkenyl-cytosin, 5-(C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkynyl-cytosin, 5-Fluoruracil, 5-Fluorcytosin, 5-Chloruracil, 5-Chlorcytosin, 5-Bromuracil, 5-Bromcytosin, oder 7-Deaza-7-substituierte Purine wie 7-Deaza-7-(C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>)-alkinylguanin, 7-Deaza-7-(C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>)-alkinyladenin, 7-Deaza-7-(C<sub>2</sub>-C<sub>7</sub>)-alkenylguanin, 7-Deaza-7-(C<sub>2</sub>-C<sub>7</sub>)-alkenyladenin, 7-Deaza-7-(C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>)-alkylguanin, 7-Deaza-7-(C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>)-alkyladenin, 7-Deaza-7-bromguanin und 7-Deaza-7-bromadenin, besonders bevorzugt für 5-(C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkyl-uracil, 5-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkenyl-uracil, 5-(C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkynyl-uracil, 5-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkyl-cytosin, 5-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkenyl-cytosin, 5-(C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkynyl-cytosin oder 7-Deaza-7-substituierte Purine, und ganz besonders bevorzugt für 5-Pentinylicytosin, 5-Hexinyluracil, 5-Hexinylcytosin, 7-Deaza-7-propinylguanin, 7-Deaza-7-propinyladenin, 7-Deaza-7-methylguanin, 7-Deaza-7-methyladenin, 7-Deaza-7-propinyladenin, 7-Deaza-7-bromguanin, 7-Deaza-7-bromadenin.

Reporter Liganden sind beispielsweise Fluorescein, Biotin, Acridin, Phenanthrolin, Phenanthridin und Eosin.

Unter D- oder L-Aminosäuren seien, falls nicht anders angegeben, besonders folgende genannt (vgl. Schröder, Lübke, Peptides, Band 1, New York 1965, Seiten XXII-XXIII; Houben-Weyl, Methoden der Organischen Chemie, Band XV/1 und 2, Stuttgart 1974):

Aad, Abu, Abu, ABz, 2ABz, Aca, Ach, Acp, Adpd, Ahb, Aib, Aib, Ala, Ala, Ala, Alg, All, Ama, Amt, Ape, Apm, Apr, Arg, Asn, Asp, Asu, Aze, Azi, Bai, Bph, Can, Cit, Cys, Cyta, Daad, Dab, Dadd, Dap, Dapm, Dasu, Djen, Dpa, Dtc, Fel, Gln, Glu, Gly, Guv, hAla, hArg, hCys, hGln, hGlu, His, hIle, hLeu, hLys, hMet, hPhe, hPro, hSer, hThr, hTrp, hTyr, hyl, Hyp, 3Hyp, Ile, Ise, Iva, Kyn, Lant, Lcn, Leu, Lsg, Lys, Lys, Lys, Met, Mim, Min, hArg, Nle, Nva, Oly, Orn, Pan, Pec, Phe, Phg, Pic, Pro, Pro, Pse, Pya, Pyr, Pza, Oin, Ros, Sar, Sec, Sem, Ser, Thi, Thi, Thr, Thy, Thx, Tia, Tle, Tly, Trp, Trta, Tyr, Val etc., deren Abkürzung ohne einen Stereodeskriptor für den Rest in der L-Form steht,

oder auch cyclische Aminosäuren, wie z. B. Pyrrolidin-2-carbonsäure; Piperidin-2-carbonsäure;

1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin-3-carbonsäure; Decahydroisochinolin-3-carbonsäure;

Octahydroindol-2-carbonsäure; Decahydrochinolin-2-carbonsäure;

Octahydrocyclopenta[b]pyrrol-2-carbonsäure;

2-Azabicyclo[2.2.2]octan-3-carbonsäure;

2-Azabicyclo[2.2.1]heptan-3-carbonsäure;

2-Azabicyclo[3.1.0]hexan-3-carbonsäure;

2-Azaspiro[4.4]nonan-3-carbonsäure;

2-Azaspiro[4.5]decan-3-carbonsäure;

Spiro[(bicyclo[2.2.1]heptan)-2,3-pyrrolidin-5-carbonsäure];

Spiro[(bicyclo[2.2.2]octan)-2,3-pyrrolidin-5-carbonsäure];

2-Azatriacyclo[4.3.0.1<sup>6,9</sup>]decan-3-carbonsäure;

Decahydrocyclohepta[b]pyrrol-2-carbonsäure;

Decahydrocycloocta[b]pyrrol-2-carbonsäure;

Octahydrocyclopenta[c]pyrrol-2-carbonsäure;

Octahydroisindol-1-carbonsäure;

2,3,3a,4,6a-Hexahydrocyclopenta[b]pyrrol-2-carbonsäure;

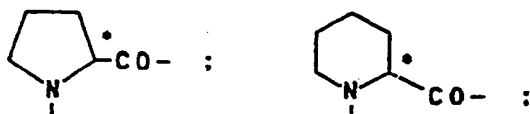
2,3,3a,4,5,7a-Hexahydroindol-2-carbonsäure;

Tetrahydrothiazol-4-carbonsäure;

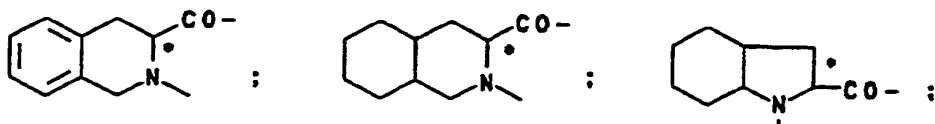
Isoxazolidin-3-carbonsäure; Pyrazolidin-3-carbonsäure;

Hydroxypyrrolidin-2-carbonsäure; die alle gegebenenfalls substituiert sein können:

5



10

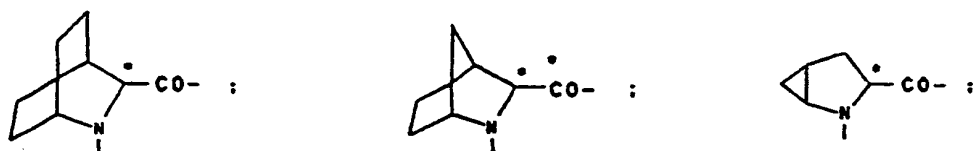


15



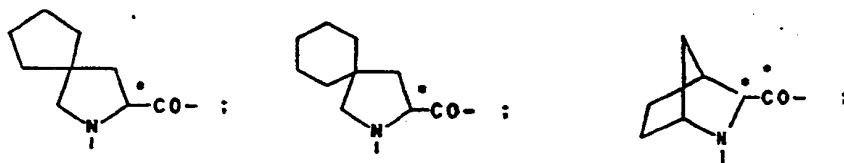
20

25



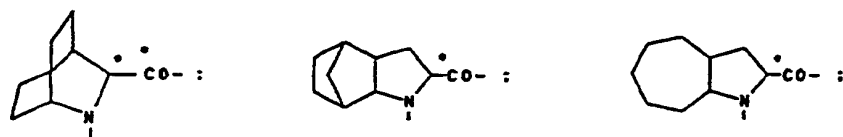
30

35



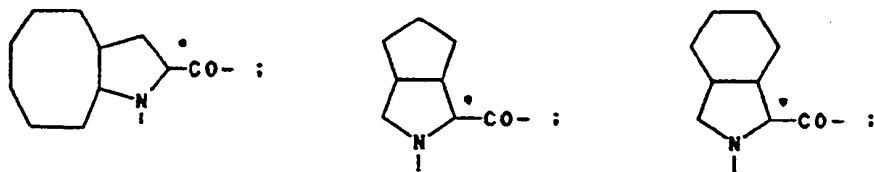
40

45



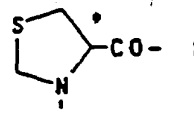
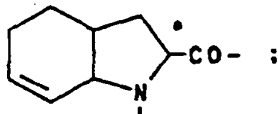
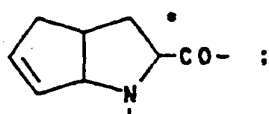
50

55

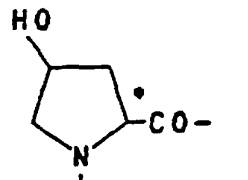
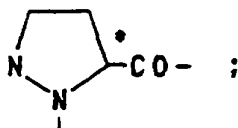
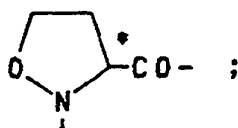


60

65



5



10

15

US-A 4,344,949, US-A 4,374,847, US-A 4,350,704, EP-A 29 488, EP-A 31 741, EP-A 46 953, EP-A 49 605, EP-A 49 658, EP-A 50 800, EP-A 51 020, EP-A 52 870, EP-A 79 022, EP-A 84 164, EP-A 89 637, EP-A 90 341, EP-A 90 362, EP-A 105 102, EP-A 109 020, EP-A 111 873, EP-A 271 865 und EP-A 344 682.

Alkyl und davon abgeleitete Reste wie beispielsweise Alkoxy und Alkylthio können verzweigt, unverzweigt oder cyclisch, gesättigt oder ein oder mehrfach ungesättigt sein.

Bevorzugt sind Verbindungen der Formel I, worin

25

n eine Zahl von Null bis 50 bedeutet;

B unabhängig voneinander für eine natürliche Nucleobase oder eine unnatürliche Nucleobase steht;

L N bedeutet;

A eine Gruppe der Formel IIb bedeutet, worin

r = 1 und s Null, und R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> = H und Y' = O und M eine Einfachbindung bedeuten;

30

D und G CHR<sup>5</sup> bedeuten;

R<sup>5</sup> für Wasserstoff steht;

X -O- bedeutet;

Y = O bedeutet;

Z für Hydroxy, Methoxy, Ethoxy, (4-Nitrophenol)ethoxy, Propoxy, iso-Propoxy, Butoxy, Pentoxy, Phenoxy oder Allyloxy steht;

35

Q und Q' unabhängig voneinander für Oligonucleotide stehen, die unmodifiziert und modifiziert sein können, wobei

a) die 3'- und/oder 5'-Phosphorsäurediesterbrücken vollständig oder teilweise durch Phosphorothioat-, Phosphorodithioat-, NR<sup>4</sup>R<sup>4'</sup>-Phosphoramidat-, Phosphat-O-Methylester-, Phosphat-O-ethylester-, Phosphat-O-isopropylester-, Methylphosphonat- oder Phenylphosphonat-Brücken ersetzt sind;

b) ein, zwei oder drei 3'- oder 5'-Phosphorsäurediesterbrücken an den Pyrimidin-Positionen und am 5'-Ende und/oder am 3'-Ende durch Formacetale und/oder 3'-Thioformacetale ersetzt sind;

c) das Zuckerphosphat-Rückgrat vollständig oder teilweise durch "PNAs" oder PNA-DNA-Hybride ersetzt ist;

45

d) die β-D-2'-Desoxyriboseeinheiten vollständig oder teilweise durch 2'-F-2'-Desoxyribose, 2'-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkyl-Ribose, 2'-O-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkenyl-Ribose, 2'-NH<sub>2</sub>-2'-desoxyribose ersetzt sind;

e) die natürlichen Nucleosid-Basen vollständig oder teilweise durch 5-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkyl-uracil, 5-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkenyl-uracil, 5-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkyl-uracil, 5-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkyl-cytosin, 5-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkenyl-cytosin, 5-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkyl-cytosin, 5-Fluoruracil, 5-Fluorcytosin, 5-Chloruracil, 5-Chlorcytosin, 5-Bromuracil, 5-Bromcytosin, 7-Deaza-7-(C<sub>2</sub>-C<sub>7</sub>)-alkinylguanin, 7-Deaza-7-(C<sub>2</sub>-C<sub>7</sub>)-alkinyladenin, 7-Deaza-7-(C<sub>2</sub>-C<sub>7</sub>)-alkenylguanin, 7-Deaza-7-(C<sub>2</sub>-C<sub>7</sub>)-alkenyladenin, 7-Deaza-7-(C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>)-alkylguanin, 7-Deaza-7-(C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>)-alkyladenin, 7-Deaza-7-bromguanin, 7-Deaza-7-bromadenin ersetzt sind.

55

Besonders bevorzugt sind Verbindungen der Formel I, worin

n eine Zahl von 1 bis 30 bedeutet;

Q und Q' unabhängig voneinander für Oligonucleotide stehen, die unmodifiziert und modifiziert sein können, wobei

60

a) die 3'- und/oder 5'-Phosphorsäurediesterbrücken vollständig oder teilweise durch Phosphorothioat-, Phosphorodithioat- oder Methylphosphonat-Brücken ersetzt sind;

b) ein, zwei oder drei 3'- oder 5'-Phosphorsäurediesterbrücken am 5'- und am 3'-Ende ersetzt sind;

c) das Zuckerphosphat-Rückgrat vollständig oder teilweise durch "PNAs" oder PNA-DNA-Hybride ersetzt ist;

65

d) die β-D-2'-Desoxyriboseeinheiten vollständig oder teilweise durch 2'-F-2'-Desoxyribose, 2'-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkyl-Ribose, 2'-O-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkenyl-Ribose, 2'-NH<sub>2</sub>-2'-desoxyribose ersetzt sind;

e) die natürlichen Nucleosid-Basen vollständig oder teilweise durch 5-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkyl-uracil, 5-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-Al-

kenyl-uracil, 5-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkynyl-uracil, 5-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkyl-cytosin, 5-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkenyl-cytosin, 5-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkynyl-cytosin, 7-Deaza-7-(C<sub>2</sub>-C<sub>7</sub>)-alkynylguanin, 7-Deaza-7-(C<sub>2</sub>-C<sub>7</sub>)-alkynyladenin, 7-Deaza-7-(C<sub>2</sub>-C<sub>7</sub>)-alkenylguanin, 7-Deaza-7-(C<sub>2</sub>-C<sub>7</sub>)-alkenyladenin, 7-Deaza-7-(C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>)-alkylguanin, 7-Deaza-7-(C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>)-alkyladenin, 7-Deaza-7-bromguanin, 7-Deaza-7-bromadenin ersetzt sind.

Ganz besonders bevorzugt sind Verbindungen der Formel I, worin n eine Zahl von 1 bis 30 bedeutet;

B unabhängig voneinander für eine natürliche Nucleobase steht;

Z für Hydroxy, Ethoxy, (4-Nitrophenol)ethoxy oder Phenoxy steht;

Q und Q' unabhängig voneinander für Oligonucleotide stehen, die unmodifiziert und modifiziert sein können, wobei

a) die 3'- und/oder 5'-Phosphorsäurediesterbrücken vollständig oder teilweise durch Phosphorothioat-Brücken ersetzt sind;

c) das Zuckerphosphat-Rückgrats vollständiger oder teilweise durch "PNAs" oder PNA-DNA-Hybride ersetzt ist;

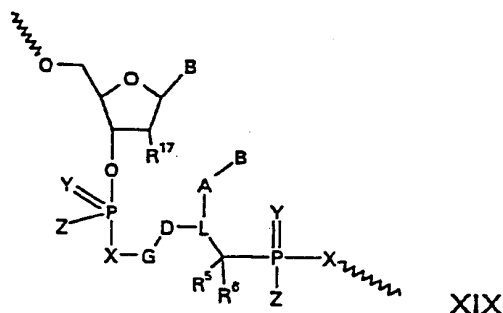
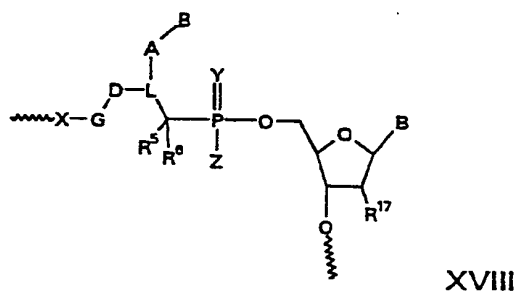
d) die β-D-2'-Desoxyriboseeinheiten vollständig oder teilweise durch 2'-O-Methyl-, 2'-O-Allyl-, 2'-O-Butyl-ribose ersetzt sind;

e) die natürlichen Nucleosid-Basen vollständig oder teilweise durch 5-Hexinylcytosin, 5-Hexinyluracil, 5-Hexinylcytosin, -Deaza-7-propinylguanin, 7-Deaza-7-propinyladenin, 7-Deaza-7-methylguanin, 7-Deaza-7-methyladenin, 7-Deaza-7-propinyladenin, 7-Deaza-7-bromguanin, 7-Deaza-7-bromadenin ersetzt sind.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Verbindungen der Formel I, in denen Q und Q' verknüpft sind, d. h. ein cyclisches Molekül bilden, wobei auch die Möglichkeit gelten soll, daß Q und Q' zusammen eine Einfachbindung ergeben,

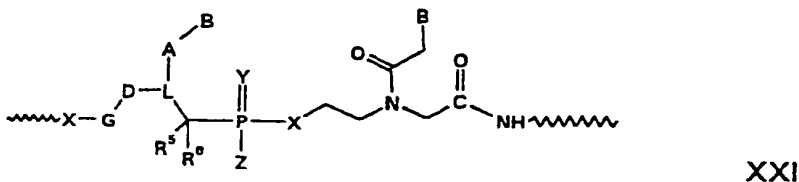
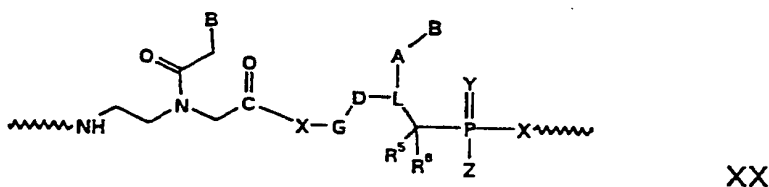
Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Oligonucleotide bzw. modifizierte Oligonucleotide, beispielsweise PNA's, in welche Verbindungen der Formel I am 3'-Ende oder am 5'-Ende oder am 5'- und am 3'-Ende eingebaut sind.

Die Verknüpfung der Oligonucleotide mit den Verbindungen der Formel I erfolgt bevorzugt über die 5'- oder 3'-Hydroxygruppe der Nucleotidbausteine, ebenfalls über eine Phosphonsäuremonoesterbindung. In den Formeln XVIII und XIX wird die Verknüpfung mit Oligonucleotiden beispielhaft verdeutlicht.



R<sup>17</sup> steht hier für H, OH, F, 2'-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkyl, 2'-O-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkenyl, bevorzugt für H oder Methoxy oder O-Allyl, besonders bevorzugt für H steht. Alle anderen Variablen sind oben erläutert.

Formel XX und Formel XXI, worin die Variablen obige Bedeutung haben, verdeutlichen beispielhaft die Verknüpfung mit PNA's.





Die Kombinationen der erfindungsgemäßen Verbindungen (abgekürzt PMENA) mit Oligonucleotiden oder modifizierten Oligonucleotiden, wie beispielsweise PNA's oder anderen Modifikationen, wie sie oben beschrieben sind, sollen schematisch nochmals verdeutlicht werden (OLIGO steht für unmodifizierte oder modifizierte Oligonucleotide):

Beispiele für solche Kombinationen sind:

5'-OLIGO-PMENA

5'-PMENA-OLIGO

5'-OLIGO-PMENA-OLIGO

5'-OLIGO-(PMENA-OLIGO)<sub>a</sub> (a = 1-20)

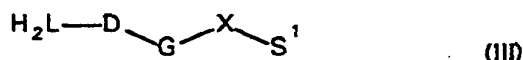
5'-PMENA-OLIGO-PMENA

5'-PMENA-(OLIGO-PMENA)<sub>a</sub> (a = 1-20)

Die Synthese dieser kombinierten Verbindungen erfolgt so, daß je nach Molekül zunächst mit der Synthese der PMENA-Bausteine, die im folgenden beschrieben wird, begonnen wird, die dann mit den Oligonucleotidbausteinen gekoppelt werden. Dabei werden die Oligonucleotide nach dem Fachmann bekannten Methoden (Sonveaux, Bioorganic Chemistry 14 (1986) 274ff) durch Festphasensynthese oder durch Lösungssynthese als Monomerbausteine oder durch Blockkondensation aufgekoppelt. Die Kondensationen erfolgen wahlweise nach der Amidit-Methode, der H-Phosphonat-Methode oder dem Phosphortriester-Verfahren (Sonveaux, Bioorganic Chemistry 14 (1986) 274ff). Werden umgekehrt PMENA-Bausteine auf OLIGO-Bausteine gekoppelt, so erfolgt dies bevorzugt nach der in f<sub>1</sub>) beschriebenen Methode. Die Konjugation mit PNA-Bausteinen erfolgt in der gleichen Weise oder, wenn (monomere oder oligomere) PNA-Bausteine auf PMENA-Bausteine aufgekoppelt werden unter den dem Fachmann bekannten Methoden der Peptid-Synthese oder der Ester-Synthese.

Gegenstand der Erfindung ist weiterhin ein Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der Formel I, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man

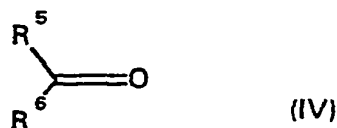
a<sub>1</sub>) Verbindungen der Formel III



worin

D, G, L und X oben genannte Bedeutungen haben und

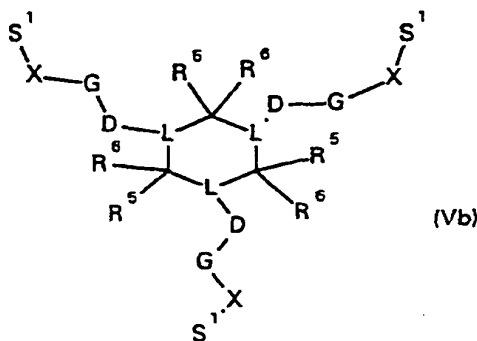
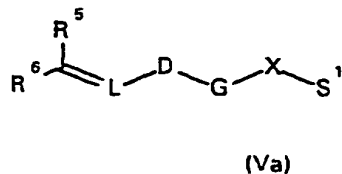
S<sup>1</sup> für eine geeignete Schutzgruppe steht, wie beispielsweise Dimethoxytrityl, Monomethoxytrityl, Trityl oder Pixyl, bevorzugt Monomethoxytrityl, mit Verbindungen der Formel IV



worin

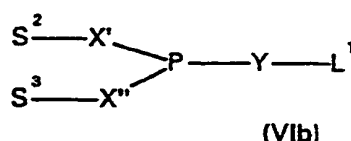
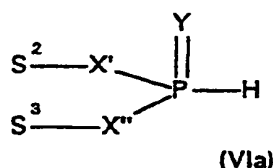
R<sup>5</sup> und R<sup>6</sup> oben genannte Bedeutungen haben,

in einem geeigneten organischen Lösungsmittel, beispielsweise in Methanol, Ethanol, iso-Propanol, Butanol, Acetonitril, Dichlormethan (DCM), Chloroform, Benzol, Dimethylformamid (DMF), Dimethylsulfoxid (DMSO), Diethylether, Essigsäureethylester (EE), Tetrahydrofuran (THF), N-Methylpyrrolidon, Petrolether, Xylol oder Toluol oder Mischungen geeigneter Lösungsmittel, bevorzugt in Methanol oder Ethanol, bei Temperaturen von 0°C bis 100°C, bevorzugt bei 10 bis 50°C, umgesetzt zu Verbindungen der Formel Va oder Vb



wobei bei der Wahl der Reaktionsbedingungen, die dem Fachmann bekannt sind (z. B. in S.R. Sandl r, W. Karo "Organic Functional Group Preparations", Vol. II, Second Edition, Academic Press, London, 1986, Chapter 12 ("Imines")) darauf zu achten ist, daß sie mit der Schutzgruppe S<sup>1</sup> kompatibel sind, d. h. wird beispielsweise eine säurelabile Schutzgruppe wie die Monomethoxytritylschutzgruppe gewählt, so sollte auf Säurezusatz bei der

b.) Verbindungen der Formel Va oder Vb mit Verbindungen der Formel VIa oder VIb, vorzugsweise mit Verbindungen der Formel VIa



worin

Y wie oben definiert ist,

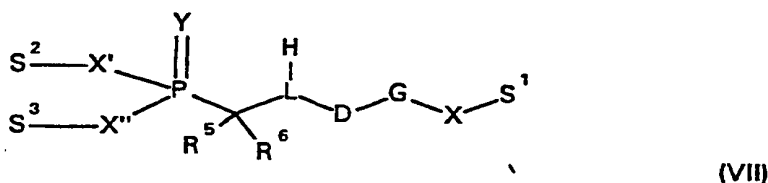
X' und X'' unabhängig voneinander wie X definiert sind,

S<sup>2</sup> und S<sup>3</sup> unabhängig voneinander Schutzgruppen bedeuten, wie beispielsweise Methyl, Ethyl, Phenyl, 2-Chlorphenyl, 2,5-Dichlorphenyl, 2,4-Dichlorphenyl, 4-Nitrophenyl, 4-Methoxyphenyl, 2-Cyanoethyl, 2-(4-Nitrophenyl)ethyl, Allyl, Benzyl, 2,2,2-Trichlor-1,1-dimethylethyl, 4-Methoxybenzyl, 2,2,2-Trichlorethyl, 8-Hydroxychinolin oder andere Phosphatschutzgruppen, wie sie dem Fachmann bekannt sind (Sonveaux, Bioorganic Chemistry 14 (1986) 274ff), bevorzugt jedoch für Methyl, Ethyl, Phenyl, 2-(4-Nitrophenyl)ethyl, Allyl, 2,2,2-Trichlorethyl stehen, und

L<sup>1</sup> für eine Abgangsgruppe, vorzugsweise für (C<sub>1</sub>—C<sub>4</sub>)-Alkyl, steht,

in einem geeigneten organischen Lösungsmittel, beispielsweise in Methanol, Ethanol, iso-Propanol, Butanol, Acetonitril, Benzol, DMF, DMSO, DCM, EE, Chloroform, Diethylether, THF, N-Methylpyrrolidon, Petrolether, Xylol oder Toluol oder Mischungen geeigneter Lösungsmittel, bevorzugt in THF, bei Temperaturen von 0°C bis 100°C, bevorzugt bei 50 bis 80°C, gegebenenfalls unter Zusatz von Basen, wie beispielsweise Tri-(C<sub>1</sub>—C<sub>6</sub>)-alkylamin, N-Alkylmorpholin, Pyridin, N,N-Dimethylaminopyridin, Butyllithium, Lithiumdiisopropylamid (LDA), Natriumhydrid, Natriumamid, Kaliumcarbonat, Caesiumcarbonat, Kalium-tert-butylat oder komplexen Basen wie Natriumamid-R<sup>11</sup>ONa, wobei R<sup>11</sup> für (C<sub>2</sub>—C<sub>6</sub>)-Alkyl oder CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>—O—CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> steht, oder ungeladenen, peralkylierten Polyamino-Phosphazen-Basen (Schwesinger, Nachr. Chem. Techn. Lab. 38 (1990) 1214; Angew. Chem. 99 (1987) 1212), bevorzugt jedoch ohne Basenzusatz,

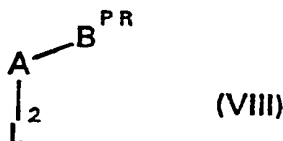
umsetzt zu Verbindungen der Formel VII



worin

D, G, L, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, S<sup>1</sup>, S<sup>2</sup>, S<sup>3</sup>, X, X', X'' und Y wie oben definiert sind;

c.) Verbindungen der Formel VII mit Verbindungen der Formel VIII,



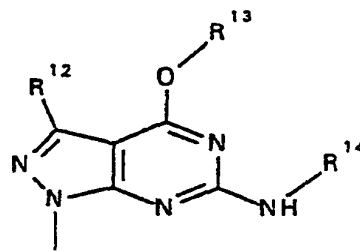
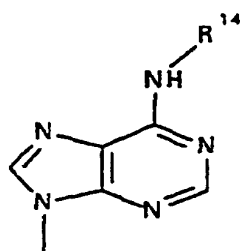
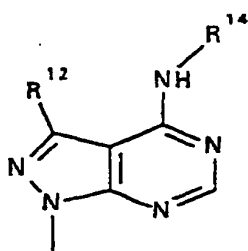
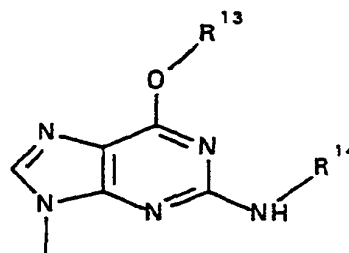
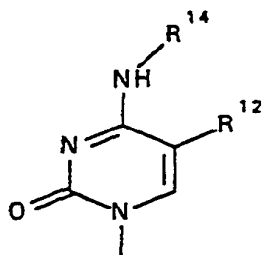
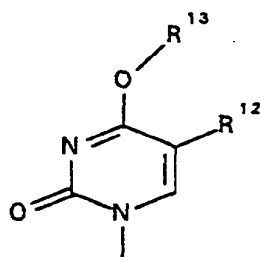
deren Synthese z. B. in Dueholm et al., J. Org. Chem. 59 (1994) 5767 beschrieben ist und

worin

A die oben genannte Bedeutung hat,

B<sup>PR</sup> die gleiche Bedeutung wie B hat, gegebenenfalls jedoch in geschützter Form vorliegt, d. h. falls B für eine natürliche oder unnatürliche Nucleobase steht, so steht B<sup>PR</sup> für die Nucleobasen, deren Amino- bzw. Hydroxygruppen durch geeignete bekannte Schutzgruppen geschützt sind, wie beispielsweise die para-Nitrophenylethylgruppe, die Benzoylgruppe, die Allylgruppe und die para-(t-Butyl)benzoylgruppe für die Hydroxygruppe und die Acetyl-, Benzoyl-, para-(t-Butyl)benzoyl-, para-(Methoxy)benzoylgruppe, para-Nitrophenylethoxygruppe

nyl-Gruppe, Isobutyryl-Gruppe, para-(t-Butyl)phenylacetyl-Gruppe, N,N-Dimethylformamidino, Fluorenylmethyloxycarbonyl-Gruppe, Benzyloxycarbonyl-Gruppe, Phenoxyacetyl-Gruppe für die Aminogruppe oder andere in der Oligonucleotid-Chemie für Nucleobasen üblichen Schutzgruppen (Sonveaux, Bioorganic Chemistry 14 (1986) 274ff; Beaucage, Tetrahedron 49 (1993) 2223ff), bevorzugt für B<sup>PR</sup> seien genannt:



worin

R<sup>12</sup> Wasserstoff, 1-Propinyl, 1-Butinyl, 1-Pentinyl oder 1-Hexinyl, insbesondere Wasserstoff, 1-Propinyl oder 1-Hexinyl; und

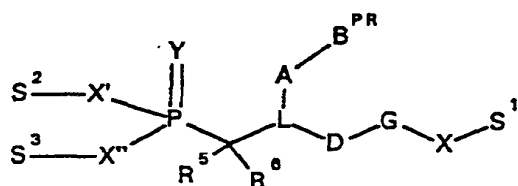
R<sup>13</sup> Wasserstoff, Diphenylcarbamoyl oder 2-(4-Nitrophenyl)ethyl steht und

R<sup>14</sup> Acetyl, Benzoyl, para-(t-Butyl)benzoyl, para-(Methoxy)benzoyl, para-Nitrophenylethyloxycarbonyl, Isobutyryl, para-(t-Butyl)phenylacetyl, Benzyloxycarbonyl oder Phenoxyacetyl bedeuten, und

L<sup>2</sup> für eine dem Fachmann bekannte Abgangsgruppe wie beispielsweise Cl, Br, O—SO<sub>2</sub>Methyl, O—SO<sub>2</sub>Trifluormethyl, OTosylat, O—C<sub>6</sub>F<sub>5</sub> steht oder, falls A die Bedeutung von Formel IIb hat auch für OH stehen kann;

in einem geeigneten organischen Lösungsmittel, beispielsweise in Acetonitril, Benzol, DMF, DMSO, DCM, EE, Chloroform, Diethylether, Tetramethylharnstoff, THF, N-Methylpyrrolidon, Petrolether, Xylol, oder Toluol oder Mischungen geeigneter Lösungsmittel, bevorzugt in DMF, bei Temperaturen von -20° C bis 100° C, bevorzugt bei 0 bis 50° C, gegebenenfalls unter Zusatz von Basen, wie beispielsweise Tri-(C<sub>1</sub>—C<sub>6</sub>)-alkylamin, N-Alkylmorpholin, Pyridin, N,N-Dimethylaminopyridin, Butyllithium, Lithiumdiisopropylamid (LDA), Natriumhydrid, Natriumamid, Kaliumcarbonat, Caesiumcarbonat, Kalium-tert.-butylat oder komplexen Basen wie Natriumamid-R<sup>11</sup>ONa, wobei R<sup>11</sup> für (C<sub>2</sub>—C<sub>6</sub>)-Alkyl oder CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>—O—CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> steht oder ungeladenen, peralkylierten Polyamino-Phosphazenen-Basen (Schwesinger, Nachr. Chem. Techn. Lab. 38 (1990)1214; Angew. Chem. 99 (1987) 1212), falls A für Formel IIb und L<sup>2</sup> für OH steht, bevorzugt unter Zusatz von Triethylamin, Diisopropylethylamin oder N-Ethylmorpholin oder ohne Basenzusatz und unter Zusatz eines zur Knüpfung von Peptid-Bindungen üblichen Kopplungsreagenzes,

umsetzt zu Verbindungen der Formel IX



(IX)

worin

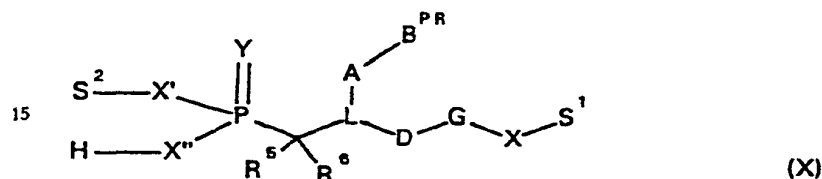
A, B<sup>PR</sup>, D, G, L, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, S<sup>1</sup>, S<sup>2</sup>, S<sup>3</sup>, X, X', X'' und Y wie oben definiert sind;

d<sub>1</sub>) aus Verbindungen der Formel IX die Schutzgruppe S<sup>3</sup> nach bekannten Verfahren (z. B. Greene, Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, J. Wiley & Sons, New York 1991) abspaltet, so z. B. für Verbindungen der Formel IX, in denen S<sup>2</sup> und S<sup>3</sup> für 2-(4-Nitrophenyl)ethyl stehen durch Behandlung mit 0.1M 1,8-Diazabicyclo[5,4,0]undec-7-en (DBU) in Pyridin oder Acetonitril bei Raumtemperatur oder für Verbindungen der Formel

IX, in denen  $S^2$  und  $S^3$  für Phenyl oder Ethyl stehen durch Behandlung mit wäßrigem Ammoniak oder für Verbindungen der Formel IX, in denen  $S^2$  für 2-(4-Nitrophenyl)ethyl und  $S^3$  für Allyl steht durch Behandlung mit  $\text{Pd}[\text{P}(\text{C}_6\text{H}_5)_3]_4$  und Triphenylphosphin in DCM (Hayakawa et al., J. Org. Chem. 58 (1993) 5551), oder für Verbindungen der Formel IX, in denen  $S^2$  für 2-(4-Nitrophenyl)ethyl und  $S^3$  für Allyl steht durch Behandlung mit 0,5M DBU in Pyridin oder Acetonitril oder für Verbindungen der Formel IX in denen  $S^2$  für 2-Cyanoethyl und  $S^3$  für Allyl steht durch Behandlung mit Triethylamin in Pyridin, oder für Verbindungen der Formel IX in denen  $S^2$  für 2-(4-Nitrophenyl)ethyl und  $S^3$  für 2,2,2-Trichlor-1,1-dimethylethyl steht durch Behandlung mit Tributylphosphin,

wobei man Verbindungen der Formel X erhält

10

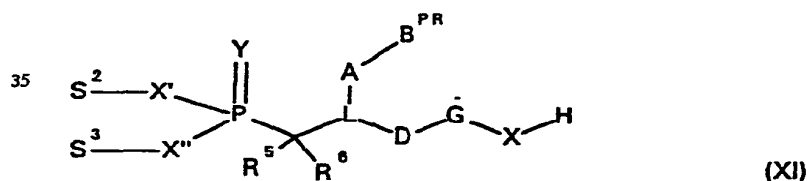


20 worin

$A, B^{PR}, D, G, L, R^5, R^6, S^1, S^2, X', X''$  und  $Y$  wie oben definiert sind;

$e_1$ ) aus Verbindungen der Formel IX die Schutzgruppe  $S^1$  nach bekannten Verfahren (z. B. Greene, Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, J. Wiley & Sons, New York 1991, Sonveaux, Bioorganic Chemistry 14 (1986) 274ff) abspaltet, so wird beispielsweise die Monomethoxytritylschutzgruppe durch Behandlung mit Säure abgespalten, beispielsweise durch Behandlung mit 80% Essigsäure, mit 1–4% Dichloressigsäure in Methylenchlorid oder Chloroform, mit 2% p-Toluolsulfonsäure in DCM/Methanol oder durch Behandlung mit 1% Trifluoressigsäure in Chloroform,

30 wobei man Verbindungen der Formel XI erhält



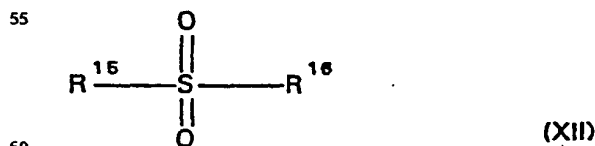
40

worin

$A, B^{PR}, D, G, L, R^5, R^6, S^2, S^3, X, X', X''$  und  $Y$  wie oben definiert sind;

$f_1$ ) Verbindungen der Formel XI mit Verbindungen der Formel X gemäß dem aus der Oligonucleotid-Chemie (Sonveaux, Bioorganic Chemistry 14 (1986) 274ff, Reese, J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1993, 2291ff) bekannten "Phosphotriester-Verfahren" in einem geeigneten organischen Lösungsmittel, wie Acetonitril, Benzol, DMF, DMSO, DCM, EE, Chloroform, Diethylether, Tetramethylharnstoff, THF, N-Methylpyrrolidon, Petrolether, Xylol oder Toluol oder Mischungen geeigneter Lösungsmittel, bevorzugt in Pyridin, bei Temperaturen von  $-20^\circ\text{C}$  bis  $100^\circ\text{C}$ , bevorzugt bei 0 bis  $50^\circ\text{C}$ , unter Zusatz eines Kopplungsreagenzes, wie beispielsweise 6-Nitrobenzotriazol-1-yloxytris(dimethylamino)-phosphonium Hexafluorophosphat (NBOP, Hashmi, Nucleosides, & Nucleotides 13 (1994) 1059), N,N-Bis[2-oxo-3-oxazolidinyl]phosphordiamidchlorid (Katti, Tetrahedron Lett. 26 (1985) 2547), 2-Chloro-5,5-dimethyl-2-oxo-1,3,2-dioxaphosphorinan (Stawinski, Nucl. Acids Res., Symp. Ser. 24, 1991, 229) oder einer Verbindung der Formel XII

55



60

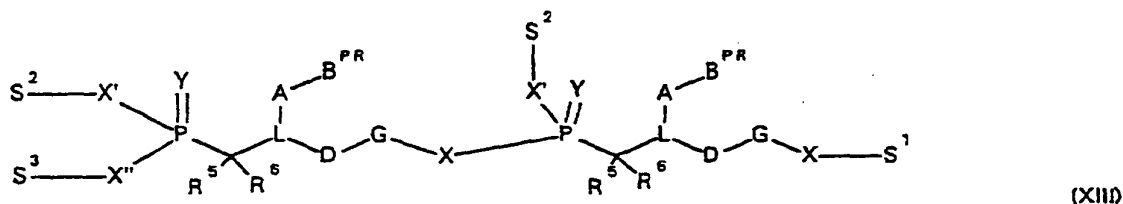
worin

$R^{15}$  für  $(\text{C}_6 - \text{C}_{12})$ -Aryl, gegebenenfalls ein bis vierfach substituiert durch  $(\text{C}_1 - \text{C}_6)$ -Alkyl,  $(\text{C}_1 - \text{C}_6)$ -Alkoxy, Nitro, Chlor, Brom und wobei gegebenenfalls ein bis 3 C-Atome durch Heteroatome, bevorzugt Stickstoff substituiert sind, d. h. beispielsweise für Phenyl, Toly, 2,4,6-Trimethylphenyl, 2,4,6-Triisopropylphenyl, 2,3,5,6-Tetramethylbenzol (Losse, Liebigs Ann. Chem. 1989, 19ff), 4-Brombenzol, 2-Nitrobenzol, 4-Nitrobenzol, 8-Chinolyl stent, bevorzugt für 2,4,6-Trimethylphenyl oder 2,4,6-Triisopropylphenyl, und

$R^{16}$  für eine Abgangsgruppe wie beispielsweise Chlor, Brom, Imidazol, Triazol, 4-Nitroimidazol, 1,2,3,4-Tetrazol,

3-Nitro-1,2,4-Triazol steht, bevorzugt unter Zusatz eines Kopplungsreagenzes der Verbindung der Formel XII, gegebenenfalls unter Zusatz eines Katalysators (Reese, J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1993, 2291 ff), wie beispielsweise N-Methylimidazol, Pyridin-N-oxiden wie etwa 4-Methoxy-pyridin-N-oxid oder 4-Ethoxy-pyridin-N-oxid, 4,6-Dinitro-1-hydroxybenzotriazol, 1-Hydroxy-5-phenyltetrazol, 1-Hydroxy-(5-(4-nitrophenyl))tetrazol, 3-Nitro-1H-1,2,4-triazol, 5-(3-Nitrophenyl)-1H-tetrazol, 5-(3,5-Dinitrophenyl)-1H-tetrazol, 5-(1-methylimidazol-2-yl)-1H-tetrazol, 5-[(1-methylimidazol-2-yl)methyl]-1H-tetrazol oder 1-Hydroxy-4-nitro-6-(trifluormethyl)benzotriazol, bevorzugt mit 4-Ethoxypyridin-N-oxid oder 4-Methoxy-pyridin-N-oxid als Katalysator, wobei die Herstellung der Kopplungsreagenzien in situ erfolgen kann, oder aber separat erfolgen und die Lösung der aktivierten Spezies in einem geeigneten Lösungsmittel zugegeben werden kann,

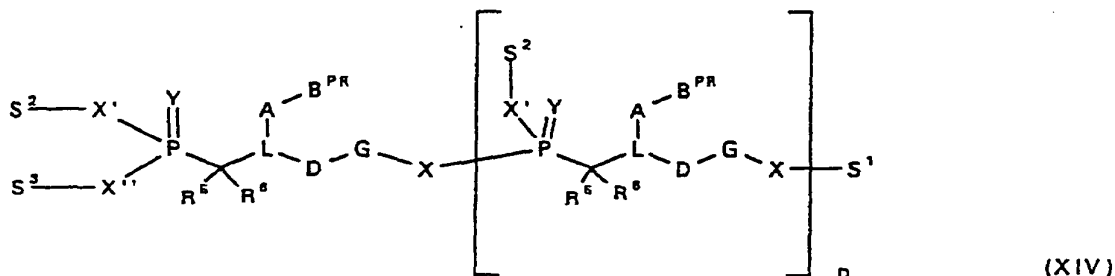
zu Verbindungen der Formel XIII



worin

A, B<sup>PR</sup>, D, G, L, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, S<sup>1</sup>, S<sup>2</sup>, S<sup>3</sup>, X, X', X'' und Y wie oben definiert sind;

g<sub>1</sub>) ausgehend von Verbindungen der Formel XIII die Schritte e<sub>1</sub>) und f<sub>1</sub>) bis zur gewünschten Kettenlänge wiederholt wobei Verbindungen der Formel XIV resultieren,



worin

A, B<sup>PR</sup>, D, G, L, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, S<sup>1</sup>, S<sup>2</sup>, S<sup>3</sup>, X, X', X'', Y und n wie oben definiert sind;

h<sub>1</sub>) die Schutzgruppen S<sup>1</sup>, S<sup>2</sup>, und S<sup>3</sup> und die Schutzgruppen an B<sup>PR</sup> nach bekannten Verfahren abspaltet (z. B. Greene, Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, J. Wiley & Sons, New York 1991), d. h. beispielsweise die Schutzgruppe S<sup>1</sup> wie in Schritt e<sub>1</sub>) beschrieben, die Schutzgruppen S<sup>2</sup> oder S<sup>3</sup>, falls sie für 2-(4-Nitrophenyl)ethyl stehen, durch Behandlung mit 0.5M 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) in Pyridin oder Acetonitril bei Raumtemperatur, falls S<sup>2</sup> oder S<sup>3</sup> für Phenyl stehen, durch Behandlung mit wäßrigem Ammoniak, falls S<sup>2</sup> oder S<sup>3</sup> für Allyl stehen, durch Behandlung mit Pd[(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>]<sub>4</sub> und Triphenylphosphin in DCM (Hayakawa et al., J. Org. Chem. 58 (1993) 5551), falls S<sup>2</sup> oder S<sup>3</sup> für 2-Cyanoethyl stehen, durch Behandlung mit Triethylamin in Pyridin, oder falls S<sup>2</sup> oder S<sup>3</sup> für 2,2,2-Trichlor-1,1-dimethylethyl stehen, durch Behandlung mit Tributylphosphin, und die Schutzgruppen an B<sup>PR</sup>, beispielsweise falls R<sup>14</sup> für para-Nitrophenylethoxycarbonyl steht, mit 0.5M DBU in Pyridin, falls R<sup>14</sup> für Isobutyryl oder Benzoyl oder para-(Methoxy)benzoyl steht, mit konz. NH<sub>4</sub>OH bei 20 bis 60°C oder, falls R<sup>13</sup> für 2-(4-Nitrophenyl)ethyl steht, durch Behandlung mit 0.5M DBU in Pyridin oder Acetonitril;

und gegebenenfalls die Gruppen Q und O' nach dem Fachmann bekannten Verfahren einführt (s. z. B. Uhlmann & Peyman, Chem. Rev. 90 (1990) 543; M. Manoharan in "Antisense Research and Applications", Crooke and Lebleu, Eds., CRC Press, Boca Raton, 1993, Chapter 17, S. 303ff; EP-A 0 552 766; S. Agrawal in Methods in Molecular Biology, Vol. 26, S. 93ff, Humana Press, Totowa 1994), und gegebenenfalls die erhaltenen Verbindungen gemäß Wang, Nucl. Acids Res. 22 (1994) 2326 cyclisiert, wodurch Verbindungen der Form II resultieren.

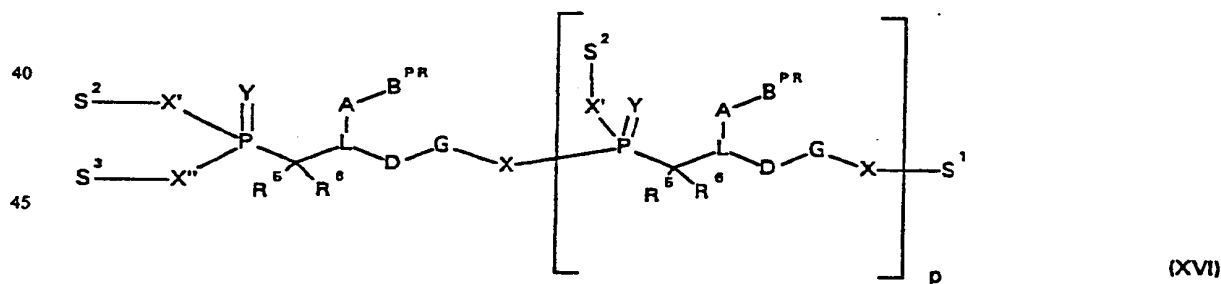
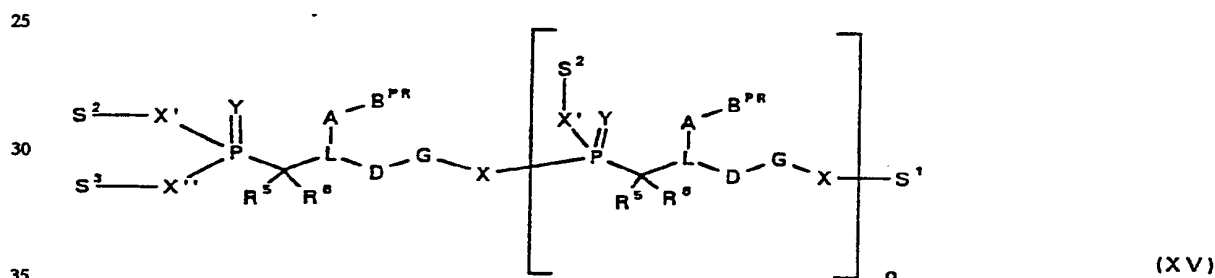
Kopplungsreagenzien zur Knüpfung von Peptid-Bindungen (siehe c<sub>1</sub>)) sind beispielsweise beschrieben in Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie, Band 15/2, Georg Thieme Verlag Stuttgart 1974 und weitere Reagenzien wie z. B. BOP (B. Castro, J.R. Dormoy, G. Evin and C. Selve, Tetrahedron Lett. 1975, 1219-1222), PyBOP (J. Coste, D. Le-Nguyen und B. Castro, Tetrahedron Lett. 1990, 205-208), BroP (J. Coste, M.-N. Dufour, A. Pantaloni und B. Castro, Tetrahedron Lett. 1990, 669-672), PyBroP (J. Coste, E. Frerot, P. Jouin und B. Castro, Tetrahedron Lett. 1991, 1967-1970) und Uronium-Reagenzien, wie z. B. HBTU (V. Dourtoglou, B. Gross, V.

- Lambropoulou, C. Zioudrou, *Synthesis* 1984, 572—574), TBTU, TPTU, TSTU, TNTU (R. Knorr, A. Trzeciak, W. Bannwarth and D. Gillesen, *Tetrahedron Letters* 1989, 1927—1930), TOTU (EP-A-0 460 446), HATU (L.A. Carpino, *J. Am. Chem. Soc.* 1993, 115, 4397—4398), HAPyU, TAPipU (A. Ehrlich, S. Rothmund, M. Brudel, M. Beyermann, L.A. Carpino und M. Bienert, *Tetrahedron Lett.* 1993, 4781—4784), BOI (K. Akaji, N. Kuriyama, T. Kimura, Y. Fujiwara und Y. Kiso, *Tetrahedron Lett.* 1992, 3177—3180) oder Säurechloride bzw. Säurefluoride (L. A. Carpino, H. G. Chao, M. Beyermann und M. Bienert, *J. Org. Chem.*, 56 (1991), 2635; J.-N. Bertho, A. Loffet, C. Pinel, F. Reuther and G. Sennyey in E. Giralt and D. Andreu (Eds.) *Peptides 1990*, Escom Science Publishers B. V. 1991, pp. 53—54; J. Green und K. Bradley, *Tetrahedron* 1993, 4141—4146), 2,4,6-Mesitylensulfonyl-3-nitro-1,2,4-triazolid (MSNT) (B. Blankemeyer-Menge, M. Nimitz und R. Frank, *Tetrahedron Lett.* 1990, 1701—1704), 2,5-Diphenyl-2,3-dihydro-3-oxo-4-hydroxythiophendioxid (TDO) (R. Kirstgen, R.C. Sheppard, W. Steglich, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1987, 1870—1871) oder aktivierte Ester (D. Hudson, *Peptide Res.* 1990, 51—55) in den jeweiligen Literaturstellen.

Bevorzugt ist ferner die Verwendung von Carbodiimiden, z. B. Dicyclohexylcarbodiimid oder Diisopropylcarbodiimid. Bevorzugt verwendet werden ebenfalls Phosphonium-Reagenzien, wie z. B. PyBOP oder PyBroP, Uronium-Reagenzien, wie z. B. HBTU, TBTU, TPTU, TSTU, TNTU, TOTU oder HATU, BOI.

Dabei kann die Kopplung direkt durch Addition von Verbindungen der Formel VIII mit dem Aktivierungsreagenz und gegebenenfalls unter Zusatz von Additiven wie z. B. 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) (W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.* 103, 788 (1970)) oder 3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydrobenzotriazin (HOObt) (W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.* 103, 2034 (1970)) durchgeführt werden oder aber die Voraktivierung des Bausteines als aktivierter Ester kann separat erfolgen und die Lösung der aktivierten Spezies in einem geeigneten Lösungsmittel zugegeben werden.

Gegenstand der Erfindung ist weiterhin ein Verfahren zur Herstellung der Verbindungen der Formel I, worin n 1 bis 100 bedeutet, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man in den Verbindungen der Formeln XV und XVI,

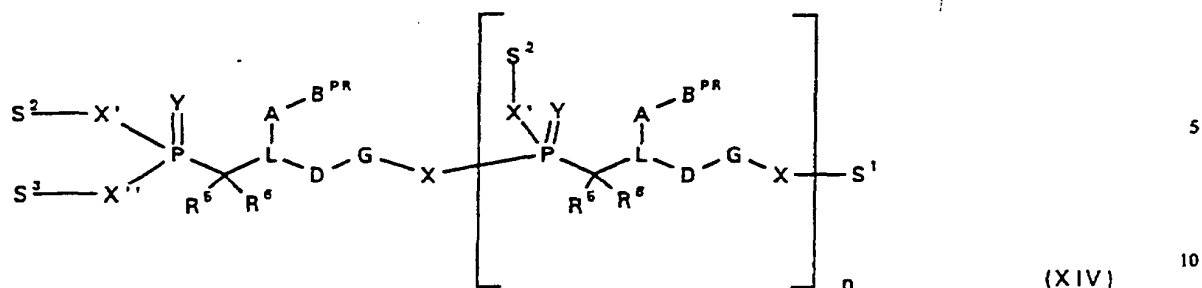


worin A, B<sup>PR</sup>, D, G, L, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, S<sup>1</sup>, S<sup>2</sup>, S<sup>3</sup>, X, X', X'' und Y wie oben definiert sind, o und p unabhängig voneinander Null bis 50, bevorzugt Null bis 20 und o + p + 1 = n bedeuten;

a<sub>2</sub>) in den Verbindungen der Formel XV die Schutzgruppe S<sup>1</sup> wie unter e<sub>1</sub>) beschrieben abspaltet,

b<sub>2</sub>) in den Verbindungen der Formel XVI die Schutzgruppe S<sup>3</sup> wie unter d<sub>1</sub>) beschrieben abspaltet und

c<sub>2</sub>) die entstehenden Verbindungen wie unter f<sub>1</sub>) beschrieben miteinander koppelt, wobei Verbindungen der Formel XIV resultieren,



worin

A, B<sup>PR</sup>, D, G, L, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, S<sup>1</sup>, S<sup>2</sup>, S<sup>3</sup>, X, X', X'', Y und n wie oben definiert sind,

d<sub>2</sub>) und diese wie unter h<sub>1</sub>) beschrieben zu Verbindungen der Formel I umsetzt.

Gegenstand der Erfindung ist weiterhin ein Verfahren zur Herstellung der Verbindungen der Formel I, das dadurch gekennzeichnet, daß man

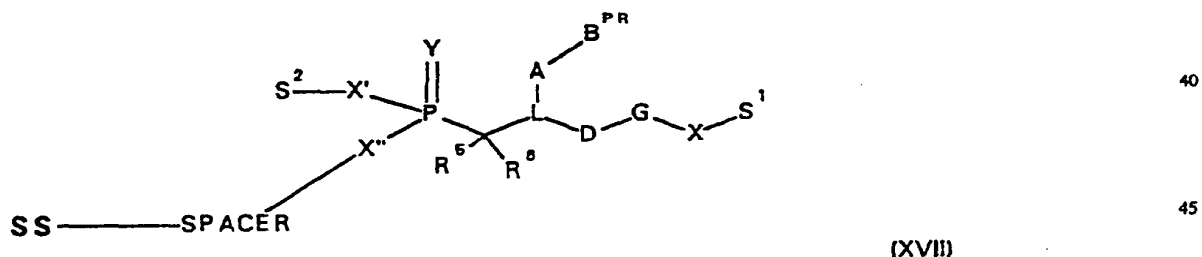
a<sub>3</sub>) Verbindungen der Formel X,



worin

A, B<sup>PR</sup>, D, G, L, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, S<sup>1</sup>, S<sup>2</sup>, X, X', X'' und Y wie oben definiert sind,

nach bekannten Verfahren über einen SPACER an einen festen Träger koppelt, zu Verbindungen der Formel XVII,



worin

A, B<sup>PR</sup>, D, G, L, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, S<sup>1</sup>, S<sup>2</sup>, X, X', X'' und Y wie oben definiert sind,

SS für einen zur Festphasensynthese geeigneten festen Träger steht, wie beispielsweise Aminopropyl-CPG (CPG = <sup>®</sup>Controlled Pore Glass) oder <sup>®</sup>Tentagel, und

SPACER für eine vom Träger nach erfolgter Synthese abspaltbare Gruppe steht, wie sie dem Fachmann bekannt sind (Sonveaux, Bioorganic Chemistry 14 (1986) 274ff), beispielsweise die Bis(hydroxyethyl)sulfonyl-

gruppe, wie sie in EP-A 0 552 766 (HOE 92/F012) beschrieben ist, oder SPACER für bisfunktionelle Konjugat-

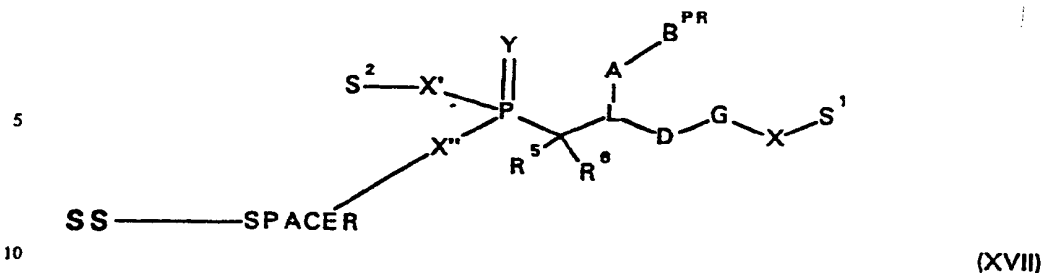
moleküle Q, die über bekannte abspaltbare Gruppen an den festen Träger geknüpft werden, beispielsweise für

Nucleotide oder Oligonucleotide, die über einen Bernsteinsäurerest an den festen Träger gebunden werden (Sonveaux, Bioorganic Chemistry 14 (1986) 274ff) oder Poly- bzw. Oligoethylenglykole, die über einen Bernstein-

säurerest an den festen Träger gebunden werden (Jäschke, Tetrahedron Lett. 34 (1993) 301) oder beispielsweise

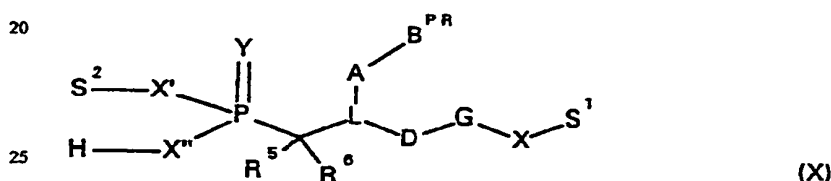
Cholesterinderivate, die über einen Bernsteinsäurerest an den festen Träger gebunden werden (MacKellar, Nucl.

b<sub>3</sub>) aus Verbindungen der Formel XVII,



worin  
 15 A, B<sup>PR</sup>, D, G, L, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, S<sup>1</sup>, S<sup>2</sup>, SS, SPACER, X, X', X'' und Y wie oben definiert sind,  
 die Schutzgruppe S<sup>1</sup> wie unter e<sub>1</sub>) beschrieben abspaltet;

c<sub>3</sub>) die resultierende Verbindung mit Verbindungen der Formel X,



worin  
 30 A, B<sup>PR</sup>, D, G, L, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, S<sup>1</sup>, S<sup>2</sup>, X', X'' und Y wie oben definiert sind, wie unter f<sub>1</sub>) beschrieben umgesetzt;

d<sub>3</sub>) die Schritte b<sub>3</sub>) und c<sub>3</sub>) bis zur gewünschten Kettenlänge wiederholt;

e<sub>3</sub>) gegebenenfalls Konjugate Q' durch bekannte Verfahren (s. z. B. Uhlmann & Peyman, Chem. Rev. 90 (1990)  
 35 543; M. Manoharan in "Antisense Research and Applications", Crooke and Lebleu, Eds., CRC Press, Boca Raton,  
 1993, Chapter 17, S. 303ff; EP-A 0 552 766; S. Agrawal in "Methods in Molecular Biology", Vol. 26, S. 93ff,  
 Humana Press, Totowa 1994) aufkoppelt;

f<sub>3</sub>) die so erzeugten Verbindungen nach bekannten Verfahren vom festen Träger abspaltet, beispielsweise den  
 40 Bis(hydroxyethyl)sulfonyl-Linker, wie in EP-A 0 552 766 (HOE 92/F012) beschrieben, durch Behandlung mit  
 DBU, den Bernsteinsäure-Linker durch Behandlung mit wäßrigem Ammoniak und die Schutzgruppen wie in  
 Schritt h<sub>1</sub>) beschrieben, wobei die Abspaltung der Schutzgruppen auch vor der Spaltung vom Träger erfolgen  
 kann.

Die Verbindungen der Formel I finden als Inhibitoren der Genexpression Verwendung. Gegenstand der  
 Erfindung sind daher die Verwendung von therapeutisch wirksamen erfindungsgemäßen Verbindungen zur  
 45 Herstellung eines Arzneimittels sowie ein Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels, das dadurch gekenn-  
 zeichnet ist, daß man die erfindungsgemäßen Verbindungen mit einem physiologisch annehmbaren Träger sowie  
 gegebenenfalls geeigneten Zusatz- und/oder Hilfsstoffen vermischt.

Als therapeutisch wirksame Verbindungen versteht man im allgemeinen solche, die aufgrund der Abfolge der  
 Bausteine B, die den Nucleobasen entsprechen eine Funktion ausüben als Analoge von Antisense Oligonucleoti-  
 50 den, Tripelhelixbildende-Oligonucleotiden, Aptameren (RNA oder DNA-Moleküle die an spezifische Zielmole-  
 küle, z. B. Proteine oder Rezeptoren, binden können (z. B. L.C. Bock et al., Nature 1992, 355, 564) oder Ribozyme  
 (katalytische RNA, s. z. B. Castanetto et al., Critical Rev. Eukar. Gene Expr. 1992, 2, 331), insbesondere als  
 Analoge von Antisense-Oligonucleotiden und Tripelhelix-bildende-Oligonucleotiden.

Darüberhinaus ist ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung die Verwendung der erfindungsgemä-  
 55 ßen Verbindungen als Diagnostikum, beispielsweise zur Detektion der Präsenz oder Absenz oder der Menge  
 eines spezifischen doppelsträngigen oder einzelsträngigen Nucleinsäuremoleküls in einer biologischen Probe.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen haben für die erfindungsgemäße Verwendung eine Länge (n-1) von ca.  
 6-100, vorzugsweise von ca. 10-40, insbesondere von ca. 12-31 Nucleotiden. Ansonsten gelten auch hier die  
 oben beschriebenen Vorzugsbereiche, Modifikationen bzw. Konjugationen.

Die Arzneimittel der vorliegenden Erfindung können beispielsweise zur Behandlung von Erkrankungen, die  
 60 durch Viren hervorgerufen werden, beispielsweise durch HIV, HSV-1, HSV-2, Influenza, VSV, Hepatitis B oder  
 Papilloma Viren, verwendet werden.

Erfindungsgemäße Sequenzen (Basenabfolgen), die gegen solche Targets wirksam sind, sind beispielsweise:

65 a) gegen HIV, z. B.



# DE 195 08 923 A1

5'-GGGGACACCCAATTCTGAAAATGGGG-3' oder  
 5'-GGGGACACCCAATTCTGAAAATGGGG-3' oder  
 5'-GGGGACACCCAATTCTGAAAATGGGG-3'

5

(I)

5'-GGGAGGTCCCTGTTCTGGGGCGCCAGGGG-3' oder  
 5'-GGGAGGTCCCTGTTCTGGGGCGCCAGGGG-3' oder

10

(II)

15

5'-GGGGTCCCTGTTCTGGGGCGCCAGGGG-3'

(XXVI)

20

5'-GGGGTCGACACCCAATTCTGAAAATGGATAA-3' oder  
 5'-GGGGTCGACACCCAATTCTGAAAATGGATAA-3' oder  
 5'-GGGGTCGACACCCAATTCTGAAAATGGATAA-3' oder  
 5'-GGGTCGACACCCAATTCTGAAAATGGATAA-3'

25

30

(III)

5'-GCTATGTCGACACCCAATTCTGAAAGGGG-3' oder  
 5'-GCTATGTCGACACCCAATTCTGAAAGGGG-3' oder  
 5'-GCTATGTCGACACCCAATTCTGAAAGGGG-3' oder  
 5'-GCTATGTCGACACCCAATTCTGAAAGGGG-3' oder  
 5'-GCTATGTCGACACCCAATTCTGAAAGGG-3'

35

40

(IV)

45

5'-GTCGCTGTCTCCGCTTCTTCTTCCTGGGGG oder  
 5'-GTCGCTGTCTCCGCTTCTTCTTCCTGGGGG oder  
 5'-GTCGCTGTCTCCGCTTCTTCTTCCTGGGGG oder

50

(V)

55

5'-GTCTCCGCTTCTTCTTCCTGCCATAGGGGG oder  
 5'-GTCTCCGCTTCTTCTTCCTGCCATAGGGGG oder

60

(VI)

65

b) gegen HSV-1, z. B.

5'-G C G G G G C T C C A T G G G G G T C G G G -3' oder  
 5'-G G C G G G G C T C C A T G G G G G T C G -3' oder  
 (VII)

5'-G G G G A G G A T G C T G A G G A G G G G G oder  
 5'-G G G G A G G A T G C T G A G G A G G G G oder  
 (XXVIII)

5'-G G G G G A G G A T G C T G A G G G G G oder  
 5'-G G G G A G G A T G C T G A G G G G G oder  
 (XXIX)

5'-G G G C A G G A G G A T G C T G A G G A G G G G G oder  
 5'-G G G G C A G G A G G A T G C T G A G G A G G G G G oder  
 (XXX)

Die Arzneimittel der vorliegenden Erfindung eignen sich beispielsweise auch zur Behandlung von Krebs oder der Restenose. Beispielsweise können dabei Sequenzen (Basenabfolgen) zum Einsatz kommen, die gegen Targets gerichtet sind, die für Krebsentstehung bzw. Krebswachstum verantwortlich sind. Solche Targets sind beispielsweise:

- 1) Nucleare Onkoproteine wie beispielsweise c-myc, N-myc, c-myb, c-fos, c-fos/jun, PCNA, p120
- 2) Cytoplasmische/Membran-assoziierte Onkoproteine wie beispielsweise EJ-ras, c-Ha-ras, N-ras, rrg, bcl-2, cdc-2, c-raf-1, c-mos, c-src, c-abl
- 3) Zelluläre Rezeptoren wie beispielsweise EG F-Rezeptor, c-erbA, Retinoid-Rezeptoren, Protein-Kinase regulatorische Untereinheit, c-fms
- 4) Cytokine, Wachstumsfaktoren, Extrazelluläre Matrix wie beispielsweise CSF-1, IL-6, IL-1a, IL-1b, IL-2, IL-4, bFGF, Myeloblastin, Fibronectin,

Erfindungsgemäße Sequenzen (Basenabfolgen), die gegen solche Targets wirksam sind, sind beispielsweise

a) gegen c-Ha-ras, z. B.

5'-G G G G C A G C T G C A A C C C A G C G G G G -3' oder  
 5'-G G G C A G C T G C A A C C C A G C G G G G -3' oder  
 5'-G G G G C A G C T G C A A C C C A G C G G G G -3' oder  
 (VIII)

c) c-myc, z. B.

5'- G G G G C T G C T G G A G C G G G G C A C A C -3' oder  
 5'- G G G G C T G C T G G A G C G G G G C A C A C G G G G -3' oder  
 5'- G G G G C T G C T G G A G C G G G G C A C A C -3' oder

(IX)

5'- G G G G A A C G T T G A G G G G C A T -3' oder  
 5'- G G G G A A C G T T G A G G G G C A T G G G G -3' oder

(X)

d) c-myb, z. B.

5'- G G G G T G C C G G G G T C T T C G G G G C -3' oder  
 5'- G G G G T G C C G G G G T C T T C G G G G C G G G G -3' oder

(XI)

5'- G G G G T G C C G G G G T C T T C G G G G G -3' oder  
 5'- G G G G T G C C G G G G T C T T C G G G G G -3' oder

(XXVII)

e) c-fos, z. B.

5'- G G G G G A G A A C A T C A T G G T C G A A A G -3' oder  
 5'- G G G G G A G A A C A T C A T G G T C G A A A G G G G -3' oder  
 5'- G G G G A G A A C A T C A T G G T C G A A A G G G G -3' oder  
 5'- G G A G A A C A T C A T G G T C G A A A G G G G G -3' oder

(XII)

5'- C C C G A G A A C A T C A T G G T C G A A G G G G G -3' oder

(XIII)

5'- G G G G A A A G C C C G G C A A G G G G G -3' oder  
 5'- G G G G G A A A G C C C G G C A A G G G G G -3'

(XIV)

f) p120 z. B.

5'-C A C C C G C C T T G G C C T C C C A C G G G G G G-3' oder

5'-C A C C C G C C T T G G C C T C C C A C G G G G G-3' oder

(XV)

g) EGF-Rezeptor, z. B.

5'-G G G G A C T C C G G C G C A G C G C-3' oder

5'-G G G G A C T C C G G C G C A G C G C G G G G-3' oder

5'-G G G G G A C T C C G G C G C A G C G C G G G G-3' oder

(XVI)

5'-G G G G C A A A C T T T C T T T T C C T C C-3' oder

5'-G G G G C A A A C T T T C T T T T C C T C C G G G G-3' oder

(XVII)

h) p53 Tumorsuppressor, z. B.

5'-G G G G G A A G G A G G A G G A T G A G G-3' oder

5'-G G G G G A A G G A G G A G G A T G A G G G G G-3' oder

(XVIII)

5'-G G G G C A G T C A T C C A G C T T C G G A G-3' oder

5'-G G G G C A G T C A T C C A G C T T C G G A G G G G-3' oder

(XIX)

i) bFGF, z. B.

5'-G G G G C T G C C A T G G T C C C-3'

5'-G G G G C T G C C A T G G T C C C G G G G-3'

(XXXI)

Die Arzneimittel der vorliegenden Erfindung eignen sich beispielsweise ferner zur Behandlung von Erkrankungen, die durch Integrine oder Zell-Zell-Adhäsionsrezeptoren beeinflusst werden, beispielsweise durch VLA-4, VLA-2, ICAM oder ELAM.

Erfindungsgemäße Sequenzen (Basenabfolgen), die gegen solche Targets wirksam sind, sind beispielsweise

a) VLA-4, z. B.

5'-GGGGGCAGTAAGCATCCATATC-3' oder

5'-GGGGGCAGTAAGCATCCATATCGGGG-3' oder

(XX)

5

b) ICAM, z. B.

10

5'-GGGGCCCCCACCCTTCCCCTCTC-3' oder

5'-CCCCCACCCTTCCCCTCTCGGGG-3' oder

15

5'-GGGGCCCCCACCCTTCCCCTCTCGGGG-3' oder

(XXI)

20

5'-GGGCTCCCCCACCCTTCCCCTCGGGG-3' oder

5'-GGCTCCCCCACCCTTCCCCTCGGGG-3' oder

25

(XXII)

5'-GGGGCTGGGAGCCATAGCGAGG-3' oder

30

5'-GGGGCTGGGAGCCATAGCGAGGGG-3' oder

5'-GGGGCTGGGAGCCATAGCGAGGGGG-3' oder

35

(XXIII)

c) ELAM-1, z. B.

40

5'-ACTGCTGCCTCTTGTCTCAGGGG-3' oder

5'-GGGGACTGCTGCCTCTTGTCTCAGGGG-3' oder

45

(XXIV)

5'-GGGGCAATCAATGACTTCAAGAGTTC-3' oder

50

5'-CAATCAATGACTTCAAGAGTTCGGGG-3'

(XXV)

55

Die Arzneimittel der vorliegenden Erfindung eignen sich beispielsweise ferner zur Behandlung von Erkrankungen, die durch Faktoren wie TNF alpha ausgelöst werden.

Erfindungsgemäße Sequenzen (Basenabfolgen), die gegen solche Targets wirksam sind, sind beispielsweise

60

a) TNF-alpha, z. B.

65

5'-GGGGGTCATGGTGTCCTTTGCAGCC oder

5'-GGGGGTCATGGTGTCCTTTGCAGCCGGGG oder

5 5'-GGGGGTCATGGTGTCCTTTGCAGCCGGGGG oder

(XXXII)

10

5'-GGGGGTCATGGTGTCCTTTGCAGGGGG oder

15 5'-TCATGGTGTCCTTTGCAGGGGG

(XXXIII)

20

Die Arzneimittel können z. B. in Form von pharmazeutischen Präparaten, die man beispielsweise topisch oder oral, z. B. in Form von Tabletten, Dragees, Hart- oder Weichgelatine kapseln, Lösungen, Emulsionen oder Suspensionen verabreichen kann, verwendet werden. Sie können auch rektal z. B. in Form von Suppositorien oder parenteral z. B. in Form von Injektionslösungen verabreicht werden. Für die Herstellung von pharmazeutischen Präparaten können diese Verbindungen in therapeutisch inerten organischen und anorganischen Trägern verarbeitet werden. Beispiele von solchen Trägern für Tabletten, Dragees und Hartgelatine kapseln sind Laktose, Maisstärke oder Derivate davon, Talk und Stearinsäure oder Salze davon. Geeignete Träger für die Herstellung von Lösungen sind Wasser, Polyole, Saccharose, Invertzucker und Glucose. Geeignete Träger für Injektionslösungen sind Wasser, Alkohole, Polyole, Glycerol und pflanzliche Öle. Geeignete Träger für Suppositorien sind pflanzliche und gehärtete Öle, Wachse, Fette und halbflüssige Polyole. Die pharmazeutischen Präparate können auch Konservierungsmittel, Lösemittel, Stabilisierungsmittel, Netzmittel, Emulgatoren, Süßstoffe, Farbstoffe, Geschmacksmittel, Salze zur Veränderung des osmotischen Drucks, Puffer, Überzugsmittel, Antioxidantien, sowie ggf. andere therapeutische Wirkstoffe enthalten. Eine bevorzugte Applikation ist die orale Applikation. Eine weitere bevorzugte Form der Verabreichung ist die Injektion. Hierzu werden die Antisense-Oligonucleotide in einer flüssigen Lösung, vorzugsweise in einem physiologisch annehmbaren Puffer, wie z. B. Hank's Lösung oder Ringer's Lösung, formuliert. Die erfindungsgemäßen therapeutisch wirksamen Verbindungen können aber auch in fester Form formuliert werden und vor dem Gebrauch gelöst oder suspendiert werden. Die für die systematische Verabreichung bevorzugten Dosierungen betragen ca. 0,01 mg/kg bis ca. 50 mg/kg Körpergewicht und Tag.

40

#### Sequenzliste

ACACCCAATTCTGAAAATGG (I),

45 AGGTCCCTGTTCCGGGCGCCA (II),

GTCGACACCCAATTCTGAAAATGGATAA (III),

GCTATGTCGACACCCAATTCTGAAA (IV),

50 GTCGCTGTCTCCGCTTCTTCTTCCTG (V),

GTCTCCGCTTCTTCTTCTGCCATAGG (VI),

55 GCGGGGCTCCATGGGGGTCG (VII),

CAGCTGCAACCCAGC (VIII),

GGCTGCTGGAGCGGGGCACAC (IX),

60 AACGTTGAGGGGCAT (X),

GTGCCGGGGTCTTCGGGC (XI),

65 GGAGAACATCATGGTCGAAAG (XII),

CCCGAGAACATCATGGTCGAAAG (XIII),

GGGGAAAGCCCGGCAAGGGG (XIV),  
 CACCCGCCTTGGCCTCCAC (XV),  
 GGGACTCCGG CGCAGCGC (XVI),  
 GGCAAACCTTTCTTTTCCTCC (XVII),  
 GGGAAAGGAGGAGGATGAGG (XVIII),  
 GGCAGTCATCCAGCTTCGGAG (XIX),  
 GCAGTAAGCATCCATATC (XX),  
 CCCCCACCACTTCCCCTCTC (XXI),  
 CTCCCCCACCACTTCCCCTC (XXII),  
 GCTGGGAGCCATAGCGAGG (XXIII),  
 ACTGCTGCCTCTTG TCTCAGG (XXIV),  
 CAATCAATGACTTCAAGAGTTC (XXV),  
 GGTCCCTGTTCGGGCGCCA (XXVI),  
 GTGCCGGGGTCTTCGGG (XXVII),  
 GGAGGATGCTGAGGAGG (XXVIII),  
 GGAGGATGCTGAGG (XXIX),  
 CAGGAGGATGCTGAGGAGG (XXX),  
 GGCTGCCATGGTCCC (XXXI),  
 TCATGGTGTCCTTTGCAGCC (XXXII),  
 TCATGGTGTCCTTTGCAG (XXXIII)

## Beispiele

## 1) N-(4-Methoxytriphenylmethoxy)ethylaminomethanphosphonsäuredi(2-(p-nitrophenyl)ethyl)ester

## 1a) N-Fluorenylmethoxycarbonyl-2-aminoethanol

8.61 g (0.141 mol) 2-Aminoethanol wurden in 250 ml Dioxan und 150 ml H<sub>2</sub>O gelöst. Bei 15–20°C wurden zunächst 17.79 g (0.212 mol) NaHCO<sub>3</sub>, dann portionsweise 50 g (0.148 mol) Fluorenylmethoxycarbonyl-N-succinimid zugegeben. Es wurde 1h bei Raumtemperatur gerührt, dann wurde zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde zwischen Dichlormethan (DCM) und H<sub>2</sub>O verteilt, die organische Phase über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum abgedampft. Der Rückstand wurde mit 100 ml Ether verrührt, das Produkt abgesaugt und gut mit Ether gewaschen. Die Ausbeute betrug 38.77 g (97%).

MS (ES+) 284.2 (M+H)<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, DMSO, TMS): = 3.05 (dd, 2H, CH<sub>2</sub>OH); 3.39 (dd, 2H, N-CH<sub>2</sub>); 4.25 (m, 3H, Ar-CH-CH<sub>2</sub>); 4.61 (t, 1H, OH); 7.14–7.98 (m, 15H, Ar-H, NH).

## 1 b) N-Fluorenylmethoxycarbonyl-2-amino-1-(4-methoxytriphenylmethoxy)ethan

10 g (35.3 mmol) N-Fluorenylmethoxycarbonyl-2-aminoethanol (aus Beispiel 1a), gelöst in 100 ml absol. N,N-Dimethylformamid (DMF) wurden bei 0°C mit 5.93 g (45.93 mmol) Diisopropylethylamin (DIPEA) und 10.91 g (35.3 mmol) 4-Methoxytriphenylmethylchlorid versetzt und zunächst 1h bei 0°C, dann 1h bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde eingedampft und zwischen DCM und einer gesättigten wäßrigen NaHCO<sub>3</sub>-Lösung verteilt. Die organische Phase wurde mit H<sub>2</sub>O gewaschen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum abgedampft. Zur Reinigung wurde über Kieselgel chromatographiert (zuerst n-Heptan/Essigsäureethylester (EE)/Triethylamin (TEA) 70/29/1; dann EE/TEA 99/1). Die Ausbeute betrug 14,4 g (73%).

MS (FAB): 562.3 (M+Li)<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, DMSO, TMS): = 2.95 (t, 2H, CH<sub>2</sub>O-MMTTr); 3.21 (dd, 2H, N-CH<sub>2</sub>); 3.75 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 4.25 (m, 3H, Ar-CH-CH<sub>2</sub>); 4.61 (t, 1H, OH); 6.80–7.96 (m, 23H, Ar-H, NH).

## 1c) 2-Amino-1-(4-methoxytriphenylmethoxy)ethan

5.0 g (9 mmol) N-Fluorenylmethoxycarbonyl-2-amino-1-(4-methoxytriphenylmethoxy)ethan (aus Beispiel 1b), gelöst in 50 ml absol. DMF wurden bei Raumtemperatur mit 6.55 g (90 mmol) Diethylamin versetzt und 2h gerührt. Zur Reinigung wurde an Kieselgel chromatographiert (zuerst n-Heptan/EE/TEA 50/49/1; dann EE/Methanol/TEA 79/20/1). Die Ausbeute betrug 2.96 g (98.7%).

MS (ES<sup>+</sup>): 340.3 (M + Li)<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, DMSO, TMS): = 2.75 (t, 2H, CH<sub>2</sub>O—MMTr); 2.93 (dd, 2H, N—CH<sub>2</sub>); 3.75 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 6.83—7.47 (m, 14H, Ar—H).

## 1d) 2-Methylimino-1-(4-methoxytriphenylmethoxy)ethan (Trimer)

2.96 g (8.9 mmol) 2-Amino-1-(4-methoxytriphenylmethoxy)ethan (aus Beispiel 1c), gelöst in 10 ml Methanol wurden unter Eiskühlung mit 1.08 g (13.22 mmol) 37% Formaldehyd versetzt und 4h bei Raumtemperatur gerührt, wobei sich ein zäher Niederschlag bildete. Das Reaktionsgemisch wurde eingedampft und zur Reinigung über Kieselgel chromatographiert (n-Heptan/EE/TEA 50/49/1). Die Ausbeute betrug 1.7 g (55%).

MS (FAB) 1042.8 (M + Li)<sup>+</sup>; 1034.8 (M—H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, DMSO, TMS): = 2.60 (t, 6H, O—CH<sub>2</sub>); 2.99 (t, 6H, N—CH<sub>2</sub>); 3.69 (s, 9H, OCH<sub>3</sub>); 6.78-7.42 (m, 42H, Ar—H).

## 1e) Di(2-(4-nitrophenyl)ethyl)phosphit

23.42 g (0.1 mol) Diphenylphosphit wurden zusammen mit 33.43 g (0.2 mol) p-Nitrophenylethanol unter Argon für 14h auf 100°C erhitzt, zur Reinigung wurde über Kieselgel chromatographiert (n-Heptan/EE 50/50; dann EE/Methanol 80/20). Ausbeute: 55%.

MS (FAB) 403.1 (M + Na)<sup>+</sup>; 381.1 (M + H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, DMSO, TMS): = 3.03 (t, 4H, Ar—CH<sub>2</sub>); 4.20 (4H, dt, O—CH<sub>2</sub>); 6.71 (d, J = 140 Hz; 1H, PH); 7.52 (d, 4H, Ar—H); 8.17 (d, 4H, Ar—H).

## 1f) N-(4-methoxytriphenylmethoxy)ethylaminomethanphosphonsäuredi(2-(p-nitrophenyl)ethyl)ester

Zu 500 mg (1.32 mmol) Di(2-(4-nitrophenyl)ethyl)phosphit (aus Beispiel 1e), gelöst in 2 ml absol. Tetrahydrofuran (THF) wurden 341 mg (0.329 mmol) 2-Methylimino-1-(4-methoxytriphenylmethoxy)ethan (Trimer) (aus Beispiel 1d) gegeben und das Gemisch wurde 3h bei 80°C gerührt. Das Lösungsmittel wurde abgedampft und es wurde noch 30 min bei 100°C gerührt. Zur Reinigung wurde über Kieselgel chromatographiert (zuerst EE/TEA 99/1; dann EE/Methanol/TEA 90/9/1). Ausbeute: 83%.

MS (FAB) 732.3 (M + Li)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, DMSO, TMS): = 2.64—3.06 (m, 10 H, Ar—CH<sub>2</sub> + P—CH<sub>2</sub> + CH<sub>2</sub>—OMMTr + N—CH<sub>2</sub>); 3.73 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 4.16 (dt, 4H, PO—CH<sub>2</sub>); 6.78—8.08 (m, 22H, Ar—H).

## 2)

N-(N<sup>6</sup>-Anisoyl)cytosin-1-yl-acetyl-N-(4-methoxytriphenylmethoxy)ethylaminomethanphosphonsäuredi(2-(p-nitrophenyl)ethyl)ester

2a) Zu 2.00 g (2.76 mmol) N-(4-methoxytriphenylmethoxy)ethylaminomethanphosphonsäuredi(2-(p-nitrophenyl)ethyl)ester (aus Beispiel 1f), gelöst in 60 ml absol. DMF, wurden 0.952 g (8.27 mmol) N-Ethylmorpholin (NEM), 0.834 g (2.76 mmol) (N<sup>6</sup>-Anisoyl)cytosin-1-yl-essigsäure und 1.153 g (3.03 mmol) O-(7-aza)benzotriazol-1-yltetramethyluroniumhexafluorophosphat (HATU, L. Carpino, J. Am. Chem. Soc. 1993, 115, 4397) zugegeben und 12h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde noch einmal die gleiche Menge HATU zugegeben und weitere 3h bei Raumtemp. gerührt. Zur Reinigung wurde an Kieselgel chromatographiert (DCM/Methanol/TEA 95/4/1). Die Ausbeute betrug 2.7 g (97%).

MS (ES<sup>+</sup>): 1012.0 (M + H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, DMSO, TMS): = 2.94 (t, 4H, P—O—CH<sub>2</sub>—CH<sub>2</sub>—Ar); 3.06 (t, 2H, MMTr—O—CH<sub>2</sub>); 3.23—3.63 (m, 4H, P—CH<sub>2</sub> + N—CH<sub>2</sub>); 3.75 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.83 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 4.10 (dt, 4H, P—O—CH<sub>2</sub>); 4.79 (s, breit, 2H, CO—CH<sub>2</sub>); 6.80—8.18 (m, 28H, Ar—H, Cytosinyl-H); 11.03 (s breit, 1H, NH).

2b) Ansatz wie in Beispiel 2a, jedoch unter Verwendung von O-(Cyan(ethoxycarbonyl)methylenamino)-1,1,3,3-tetramethyluroniumtetrafluoroborat (TOTU, EP 04 60 446) anstelle von HATU. Die Ausbeute betrug 57%. Spektroskopische Daten: s. Beispiel 2a.

## 3)

N-(N<sup>6</sup>-Anisoyl)cytosin-1-yl-acetyl-N-(4-methoxytriphenylmethoxy)ethylaminomethanphosphonsäure(2-(p-nitrophenyl)ethyl)monoester (Triethylammoniumsalz)

1 g (0.99 mmol) N-(N<sup>6</sup>-Anisoyl)cytosin-1-yl-acetyl-N-(4-methoxytriphenylmethoxy)ethylaminomethanphosphonsäuredi(2-(p-nitrophenyl)ethyl)ester (aus Beispiel 2) wurden in 20 ml einer 0.1M Lösung 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) in absol. Acetonitril gelöst und 4h bei Raumtemp. gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde zwischen DCM und einer wäßrigen KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Lösung (pH 7) verteilt, die organische Phase wurde über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum abgedampft. Zur Reinigung wurde über Kieselgel chromatographiert (EE/Methanol/TEA 70/29/1). Die Ausbeute betrug 540 mg (57%).

MS (FAB): 906.5 (M—H + 2Na)<sup>+</sup>; 884.6 (M + Na)<sup>+</sup>; 862.5 (M + H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, DMSO, TMS): = 3.00 (m, 4H, P—O—CH<sub>2</sub>—CH<sub>2</sub>—Ar + MMTr—O—CH<sub>2</sub>); 3.38—3.60 (m, 4H, P—CH<sub>2</sub> + N—CH<sub>2</sub>); 3.73 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.82 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 4.01 (dt, 2H, P—O—CH<sub>2</sub>); 4.79 & 5.03 (jeweils s, breit, 2H, CO—CH<sub>2</sub>); 6.78—8.20 (m, 24H, Ar—H, Cytosinyl-H); 11.00 (s breit, 1H, NH).



4)

N-(N<sup>6</sup>-Anisoyl)cytosin-1-yl-acetyl-N-(2-hydroxy)ethylaminomethanphosphonsäuredi(2-(p-nitrophenyl)ethyl)ester

1.00 g (0.99 mmol) N-(N<sup>6</sup>-Anisoyl)cytosin-1-yl-acetyl-N-(4-methoxytriphenylmethoxy)ethylaminomethanphosphonsäuredi(2-(p-nitrophenyl)ethyl)ester (aus Beispiel 2) wurden in 80 ml 80% wäßriger Essigsäure gelöst und 4h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde abgedampft und es wurde zweimal mit Toluol koevaporiert. Zur Reinigung wurde über Kieselgel chromatographiert (EE/Methanol/TEA 85/14/1). Die Ausbeute betrug 522 mg (71%).

MS (FAB): 761.2 (M + Na)<sup>+</sup>; 739.3 (M + H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, DMSO, TMS): = 2.98 (t, 4H, P-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Ar); 3.38-3.67 (m, 4H, N-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-OH); 3.80-3.89 (m, 2H, P-CH<sub>2</sub>); 3.91 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 4.12 (dt, 4H, P-O-CH<sub>2</sub>); 4.78 & 4.87 (jew. s, breit, 2H, CO-CH<sub>2</sub>); 6.98-8.19 (m, 14H, Ar-H, Cytosinyl-H); 11.02 (s breit, 1H, NH).

5) 5'-MMTr-C<sup>AN</sup>-P(ONPE)-C<sup>AN</sup>-P(ONPE)<sub>2</sub>

Die Synthese erfolgte analog Beispiel 17 aus N-(N<sup>6</sup>-Anisoyl)cytosin-1-yl-acetyl-N-(4-methoxytriphenylmethoxy)ethylaminomethanphosphonsäure(2-(p-nitrophenyl)ethyl)monoester (Triethylammoniumsalz) (Beispiel 3) und N-(N<sup>6</sup>-Anisoyl)cytosin-1-yl-acetyl-N-(2-hydroxy)ethylaminomethanphosphonsäuredi(2-(p-nitrophenyl)ethyl)ester (Beispiel 4). Zur Reinigung wurde über Kieselgel chromatographiert (EE/Methanol/TEA 85/14/1). Ausbeute: 73%.

MS(FAB) 1605 (M + Na)<sup>+</sup>; 1583 (M + H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, DMSO, TMS): = 2.94-3.18 (m, 6H, P-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Ar); 3.26-3.95 (m, 10 H); 3.75 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.85 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>); 3.99-4.36 (m, 8H, P-O-CH<sub>2</sub>); 4.75-4.92 (m, breit, 4H, CO-CH<sub>2</sub>); 6.83-8.18 (m, 38H, Ar-H, Cytosinyl-H); 10.98 & 11.03 (jew. s breit, 2H, NH).

6) 5'-HO-C<sup>AN</sup>-P(ONPE)-C<sup>AN</sup>-P(ONPE)<sub>2</sub>

Die Synthese erfolgte analog Beispiel 4 aus 5'-MMTr-C<sup>AN</sup>-P(ONPE)-C<sup>AN</sup>-P(ONPE)<sub>2</sub> (Beispiel 5). Zur Reinigung wurde über Kieselgel chromatographiert (EE/Methanol/TEA 85/14/1). Die Ausbeute betrug 74%.

MS (FAB) 1332.4 (M + Na)<sup>+</sup>; 1310.3 (M + H)<sup>+</sup>.

## 7) N-(4-methoxytriphenylmethoxy)ethylaminomethanphosphonsäurediethylester

Die Synthese erfolgte analog Beispiel 1f, jedoch mit Diethylphosphit. Ausbeute: 87.5%.

MS(FAB) 490.2 (M + Li)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, DMSO, TMS): = 1.22 (t, 6H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>); 2.80 (t, 2H, N-CH<sub>2</sub>); 2.91 (d, J = 12.5 Hz, 2H, P-CH<sub>2</sub>); 3.02 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-OMMTTr); 3.75 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 4.01 (dq, 4H, PO-CH<sub>2</sub>); 6.84-7.45 (m, 14H, Ar-H).

## 8) N-Thymin-1-yl-acetyl-N-(4-methoxytriphenylmethoxy)ethylaminomethanphosphonsäurediethylester

Zu 2.04 g (4.22 mMol) N-(4-methoxytriphenylmethoxy)ethylaminomethanphosphonsäurediethylester (Beispiel 7), gelöst in 50 ml absol. DMF wurden zugegeben 570.3 mg (4.22 mMol) Hydroxybenzotriazol (HOBT), 972.1 mg (8.44 mMol) NEM, 777 mg (4.22 mMol) Tymidin-1-yl-essigsäure und 639 mg (5.06 mMol) Diisopropylcarbodiimid. Es wurde 16 h bei Raumtemperatur gerührt, das Lösungsmittel abgedampft, der Rückstand wurde in DCM gelöst und mit gesättigter wäßriger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung, dann mit gesättigter wäßriger NaCl-Lösung estrahiert. Es wurde über Natriumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel abgedampft. Zur Reinigung wurde über Kieselgel chromatographiert (EE/Methanol/TEA 98/2/1). Die Ausbeute betrug 2.47 g (90%).

MS (FAB): 662.3 (M + Na)<sup>+</sup>; 656.3 (M + Li)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, DMSO, TMS): = 1.12-1.32 (m, 6H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>); 1.68 & 1.75 (je. s, 3H, T-CH<sub>3</sub>); 3.10-3.40 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-OMMTTr); 3.53-3.70 (m, 4H, P-CH<sub>2</sub> + N-CH<sub>2</sub>); 3.75 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.83-4.16 (m, 4H, PO-CH<sub>2</sub>); 4.62 & 4.72 (jew. s, 2H, CO-CH<sub>2</sub>); 6.83-7.42 (m, 15H, Ar-H, T-H); 11.28 (s, 1H, NH).

## 9) N-Thymin-1-yl-acetyl-N-(4-methoxytriphenylmethoxy)ethylaminomethanphosphonsäuremonoethylester (Triethylammoniumsalz)

811 mg (1.25 mMol) N-Thymin-1-yl-acetyl-N-(4-methoxytriphenylmethoxy)ethylaminomethanphosphonsäurediethylester (Beispiel 8) wurden in 3.75 ml 1N NaOH suspendiert. Es wurde 3h bei Raumtemperatur, dann 6h bei 50°C gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde im Vakuum eingengt, der Rückstand über Kieselgel chromatographiert (EE/Methanol/TEA 100/10/10, dann 100/40/10). Die Ausbeute betrug 897 mg (99.5%).

MS (ES-): 620.4 (M - H)<sup>-</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, DMSO, TMS): = 1.18 (t, 9H, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>); 1.68 & 1.74 (jew. s, 3H, T-CH<sub>3</sub>); 2.96-3.08 (q, 6H, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>); 3.35 (m, 2H, N-CH<sub>2</sub>); 3.43-3.70 (d, J = 11 Hz, 2H, P-CH<sub>2</sub>); 3.63 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-OMMTTr); 3.75 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.78 (dq, 2H, PO-CH<sub>2</sub>); 4.60 & 4.86 (jew. s, 2H, CO-CH<sub>2</sub>); 6.82-7.41 (m, 15H, Ar-H, T-H); 11.24 (s, 1H, NH).

## 10) N-Thymin-1-yl-acetyl-N-(2-hydroxy)ethylaminomethanphosphonsäurediethylester

Die Synthese erfolgte analog Beispiel 4 aus N-Thymin-1-yl-acetyl-N-(4-methoxytriphenylmethoxy)ethylaminomethanphosphonsäurediethylester (Beispiel 8). Zur Reinigung wurde über Kieselgel chromatographiert (EE/

Methanol 90/10). Ausbeute: 80%.

MS (FAB): 400.1 (M + Na)<sup>+</sup>; 378.1 (M + H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, DMSO, TMS): = 1.17–1.32 (m, 6H, CH<sub>2</sub>–CH<sub>3</sub>); 1.78 (s, 3H, T–CH<sub>3</sub>); 3.40–3.69 (m, 4H, CH<sub>2</sub>–OH + N–CH<sub>2</sub>); 3.89 (d, J = 11 Hz, 2H, P–CH<sub>2</sub>); 3.92–4.19 (m, 4H, PO–CH<sub>2</sub>); 4.70 (s, 2H, CO–CH<sub>2</sub>); 4.98 (t, 1H, OH); 7.22 & 7.30 (jew. s., 1H, T–H); 11.25 (s, 1H, NH).

#### 11) N-(4-methoxytriphenylmethoxy)ethylaminomethanphosphonsäurediphenylester

Die Synthese erfolgte analog Beispiel 1f, jedoch mit Diethylphosphit. Ausbeute: 100%.

MS(FAB) 58.2 (M + Li)<sup>+</sup>.

#### 12) N-Thymin-1-yl-acetyl-N-(4-methoxytriphenylmethoxy)ethylaminomethanphosphonsäuremonophenylester (Triethylammoniumsalz)

Die Synthese erfolgte analog Beispiel 8l aus N-(4-methoxytriphenylmethoxy)ethylaminomethanphosphonsäurediphenylester (Beispiel 11) und Thymin-1-yl-essigsäure. Zur Reinigung wurde über Kieselgel chromatographiert (EE/Methanol/TEA/H<sub>2</sub>O 90/10/5/0.5). Ausbeute: 47%.

MS (FAB): 682.3 (M + 2Li–H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, DMSO, TMS): = 1.16 (t, 9H, N–CH<sub>2</sub>–CH<sub>3</sub>); 1.67 & 1.72 (je. s, 3H, T–CH<sub>3</sub>); 2.96–3.70 (m, 12H, N–CH<sub>2</sub>–CH<sub>3</sub> + N–CH<sub>2</sub> + P–CH<sub>2</sub> + CH<sub>2</sub>–OMMTTr); 3.75 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 4.58 & 4.88 (jew. s, 2H, CO–CH<sub>2</sub>); 6.74–7.46 (m, 20 H, Ar–H, T–H); 11.23 (s, 1H, NH).

#### 13)

#### N-Thymin-1-yl-acetyl-N-(4-methoxytriphenylmethoxy)ethylaminomethanphosphonsäurephenyl-(4-nitrophenylethyl)diester

385.4 mg (0.5 mMol) N-Thymin-1-yl-acetyl-N-(4-methoxytriphenylmethoxy)-ethylaminomethanphosphonsäuremonophenylester (Triethylammoniumsalz) (Beispiel 12) und 92 mg (0.55 mMol) (4-Nitrophenylethanol) wurden dreimal mit absol. Pyridin koevaporiert, anschließend in 15 ml absol. Pyridin gelöst. Bei 0°C wurden 403.4 mg (0.15 mMol) 3-Nitro-1-(p-toluolsulfonyl)-1H-1,2,4-triazol (TSNT) zugegeben, anschließend 16h bei 0–5°C gerührt, das Pyridin im Vakuum abdestilliert, der Rückstand in EE aufgenommen und nacheinander mit gesättigter wäßriger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung, dann mit NaCl-Lösung gewaschen. Zur Reinigung wurde über Kieselgel chromatographiert (EE/TEA 100/2). Die Ausbeute betrug 162 mg.

MS (FAB): 831.3 (M + 2Li–H)<sup>+</sup>; (M + Li)<sup>+</sup>.

#### 14)

#### N-Thymin-1-yl-acetyl-N-(4-methoxytriphenylmethoxy)ethylaminomethanphosphonsäuredi(2-(p-nitrophenyl)ethyl)ester

Die Synthese erfolgte analog Beispiel 8 aus N-(4-methoxytriphenylmethoxy)-ethylaminomethanphosphonsäuredi(2-(p-nitrophenyl)ethyl)ester (Beispiel 1f) und Thymin-1-yl-essigsäure. Ausbeute: 63%

MS (ES<sup>+</sup>): 898.4 (M + Li)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, DMSO, TMS): = 1.65 & 1.72 (jew. s, 3H, T–CH<sub>3</sub>); 2.96 (t, 4H, P–O–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–Ar); 3.06 (t, 2H, N–CH<sub>2</sub>); 3.67 (d, J = 11 Hz, 2H, P–CH<sub>2</sub>); 3.70 (m, 2H, MMTTr–O–CH<sub>2</sub>); 3.75 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.83 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 4.10 (dt, 4H, P–O–CH<sub>2</sub>); 4.59 & 4.62 (jew. s, breit, 2H, CO–CH<sub>2</sub>); 6.83–8.18 (m, 23H, Ar–H, T–H); 11.30 (s breit, 1H, NH).

#### 15)

#### N-Thymin-1-yl-acetyl-N-(4-methoxytriphenylmethoxy)ethylaminomethanphosphonsäure-(4-nitrophenylethyl)monoester (Triethylammoniumsalz)

#### 15a) Aus 30 mg

#### N-Thymin-1-yl-acetyl-N-(4-methoxytriphenylmethoxy)ethylaminomethanphosphonsäurephenyl-(4-nitrophenylethyl)diester (Beispiel 13)

30 mg N-Thymin-1-yl-acetyl-N-(4-methoxytriphenylmethoxy)ethylaminomethanphosphonsäurephenyl-(4-nitrophenylethyl)diester (Beispiel 13) wurden in einer Mischung aus 1 ml TEA, 1 ml Dioxan und 80 mg p-Nitrobenzaldehyd gelöst und 3h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum abgedampft, der Rückstand dreimal mit Pyridin und zweimal mit Toluol koevaporiert. Der Rückstand wurde über Kieselgel chromatographiert (EE/TEA 100/2, dann EE/Methanol/TEA 60/40/2). Die Ausbeute betrug 23 mg.

MS (FAB): 755.3 (M + 2Li–H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, DMSO, TMS): = 1.15 (t, 9H, N–CH<sub>2</sub>–CH<sub>3</sub>); 1.60 & 1.79 (m, 3H, T–CH<sub>3</sub>); 2.80–3.3.60 (m, 14H, N–CH<sub>2</sub>–CH<sub>3</sub> + N–CH<sub>2</sub> + P–CH<sub>2</sub> + CH<sub>2</sub>–OMMTTr + Ar–CH<sub>2</sub>); 3.73 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 4.01 (dt, 2H, P–O–CH<sub>2</sub>); 4.58–4.92 (m, 2H, CO–CH<sub>2</sub>); 6.82–8.18 (m, 19H, Ar–H, T–H); 11.30 (s, 1H, NH).

#### 15b) Aus

#### N-Thymin-1-yl-acetyl-N-(4-methoxytriphenylmethoxy)ethylaminomethanphosphonsäuredi(2-(p-nitrophenyl)ethyl)ester (Beispiel 14)

Die Synthese erfolgte analog Beispiel 3 aus N-Thymin-1-yl-acetyl-N-(4-methoxytriphenylmethoxy)ethylami-

nomethanphosphonsäuredi(2-(p-nitrophenyl)ethyl)ester (Beispiel 14), jedoch in Pyridin als Lösungsmittel. Ausbeute: 82%. Spektroskopische Daten s. Beispiel 15a.

16) N—Thymin-1-yl-acetyl-N-(4-methoxytriphenylmethoxy)ethylaminomethanphosphonsäure

Die Synthese erfolgte analog Beispiel 15b. Als Nebenprodukt wird in 18% Ausbeute N-Thymin-1-yl-acetyl-N-(4-methoxytriphenylmethoxy)ethylaminomethanphosphonsäure erhalten.

MS (ES<sup>-</sup>): 592.2 (M—H)<sup>-</sup>.

17) 5'—MMTr-T—P(OEthyl)-T—P(OEthyl)<sub>2</sub>

361 mg (0.5 mMol) N-Thymin-1-yl-acetyl-N-(4-methoxytriphenylmethoxy)ethylaminomethanphosphonsäuremonoethylester (Triethylammoniumsalz) (Beispiel 9) und 188.7 mg (0.5 mMol) N-Thymin-1-yl-acetyl-N-(2-hydroxy)ethylaminomethanphosphonsäurediethylester (Beispiel 10) wurden zusammen zweimal mit absol. Pyridin koevaporiert. Bei 5—10°C wurden 1.5 mMol TSNT zugegeben und es wurde 16h bei Raumtemp. gerührt. Das Pyridin wurde im Vakuum abgedampft, der Rückstand in EE gelöst und nacheinander mit gesättigter wäßriger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung, dann mit NaCl-Lösung gewaschen. Es wurde über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, eingeengt und zur Reinigung wurde über Kieselgel chromatographiert (EE/Methanol/TEA 92/8/2). Die Ausbeute betrug 223 mg (46%).

MS (FAB): 987.5 (M+Li)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, DMSO, TMS) Charakteristische Signale sind: Ar—H & Thymin-H: 6.82—7.43 (m, 16H); CO—CH<sub>2</sub>: 4.59—4.78 (m, 4H); Thymin-CH<sub>3</sub>: 1.63—1.80 (m, 6H).

18) 5'—HO—T—P(OEthyl)-T—P(OEthyl)<sub>2</sub>

Die Synthese erfolgte analog Beispiel 4 aus 5'—MMTr-T—P(OEthyl)-T—P(OEthyl)<sub>2</sub> (Beispiel 17). Zur Reinigung wurde über Kieselgel chromatographiert (EE/Methanol/TEA 85/15/2, dann 100/50/1.5). Die Ausbeute betrug 95%.

MS (FAB): 731.2 (M+Na)<sup>+</sup>; 709.1 (M+H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, DMSO, TMS) Charakteristische Signale sind: Thymin-H: 7.21—7.36 (m, 2H); CO—CH<sub>2</sub>: 4.60—4.76 (m, 4H); Thymin-CH<sub>3</sub>: 1.63—1.79 (m, 6H).

19) 5'—MMTr-T—P(OPhenyl)-T—P(OEthyl)<sub>2</sub>

Die Synthese erfolgte analog Beispiel 17 aus N-Thymin-1-yl-acetyl-N-(2-hydroxy)ethylaminomethanphosphonsäurediethylester (Beispiel 10) und N-Thymin-1-yl-acetyl-N-(4-methoxytriphenylmethoxy)ethylaminomethanphosphonsäuremonophenylester (Triethylammoniumsalz) (Beispiel 12). Zur Reinigung wurde über Kieselgel chromatographiert (EE/Methanol/TEA 93/7/2). Ausbeute: 58%.

MS (FAB): 1051.4 (M+Na)<sup>+</sup>; 1029.5 (M+H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, DMSO, TMS) Charakteristische Signale sind: Ar—H & Thymin-H: 6.82—7.53 (m, 21H); CO—CH<sub>2</sub>: 4.52—4.82 (m, 4H); Thymin-CH<sub>3</sub>: 1.62—1.80 (m, 6H).

20) N-Thymin-1-yl-acetyl-N-(2-hydroxyethyl)aminomethanphosphonsäuredi(4-nitrophenylethyl)ester

Die Synthese erfolgte analog Beispiel 4 aus N-Thymin-1-yl-acetyl-N-(4-methoxytriphenylmethoxy)ethylaminomethanphosphonsäuredi(2-(p-nitrophenyl)ethyl)ester (Beispiel 14). Zur Reinigung wurde über Kieselgel chromatographiert (EE/Methanol 90/10). Ausbeute: 85%.

MS (ES<sup>+</sup>): 620.3 (M+H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO, TMS): = 1.73 (s, 3H, T—CH<sub>3</sub>); 2.97 (t, 4H, P—O—CH<sub>2</sub>—CH<sub>2</sub>—Ar); 3.41 (m, 2H, N—CH<sub>2</sub>); 3.59 (m, 2H, CH<sub>2</sub>—OH); 3.83 (d, 2H, J = 11 Hz; P—CH<sub>2</sub>); 4.08—4.30 (m, 4H, P—O—CH<sub>2</sub>); 4.54 & 4.78 (jew. s, breit, 2H, CO—CH<sub>2</sub>); 4.99 (t, 1H, OH); 7.14—8.19 (m, 9H, Ar—H, Thyminidyl-H); 11.30 (s breit, 1H, NH).

21) 5'—MMTr-T—P(ONPE)—T—P(OEthyl)<sub>2</sub>

Die Synthese erfolgte analog Beispiel 17 aus N-Thymin-1-yl-acetyl-N-(2-hydroxy)ethylaminomethanphosphonsäurediethylester (Beispiel 10) und N-Thymin-1-yl-acetyl-N-(4-methoxytriphenylmethoxy)ethylaminomethanphosphonsäure-(4-nitrophenylethyl)monoester (Triethylammoniumsalz) (Beispiel 10) Anstelle von TSNT wurde 3-Nitro-1-(2,4,6-Triisopropylphenyl-sulfonyl)-1H-1,2,4-triazol (TIPSNT) zur Kupplung eingesetzt. Zur Reinigung wurde über Kieselgel chromatographiert (EE/Methanol/TEA 95/5/2, dann 90/10/2). Ausbeute: > 90%.

MS (ES<sup>+</sup>): 1109.0 (M+Li)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, DMSO, TMS) Charakteristische Signale sind: Ar—H & Thymin-H: 6.82—8.18 (m, 20H); CO—CH<sub>2</sub>: 4.51—4.76 (m, 4H); Thymin-CH<sub>3</sub>: 1.61—1.78 (m, 6H).

22) 5'—MMTr-T—P(ONPE)—T—P(OEt)<sub>2</sub>

Die Synthese erfolgte analog Beispiel 21 aus N-Thymin-1-yl-acetyl-N-(2-hydroxy)ethylaminomethanphosphonsäurediethylester (Beispiel 10) und N-Thymin-1-yl-acetyl-N-(4-methoxytriphenylmethoxy)ethylaminomethanphosphonsäure-(4-nitrophenylethyl)monoester (Triethylammoniumsalz) (Beispiel 15). Anstelle von TSNT wurde 3-Nitro-1-(2,4,6-Triisopropylphenyl-sulfonyl)-1H-1,2,4-triazol (TIPSNT) zur Kupplung eingesetzt. Ausbeute: > 90%.

Spektroskopische Daten siehe Beispiel 21.

23) 5'-HO-T-P(ONPE)-T-P(OEt)<sub>2</sub>

Die Synthese erfolgte analog Beispiel 4 aus "5'-MMTr-T-P(ONPE)-T-P(OEt)<sub>2</sub>" (Beispiel 22). Zur Reinigung wurde über Kieselgel chromatographiert (EE/Methanol/TEA 90/10/2, dann 80/20/2). Die Ausbeute betrug 75%.

MS (ES +): 836.3 (M + Li)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, DMSO, TMS) Charakteristische Signale sind: Ar-H & Thymin-H: 7.11–8.22 (m, 6H); CO-CH<sub>2</sub>: 4.55–4.77 (m, 4H); Thymin-CH<sub>3</sub>: 1.71 (s, breit, 6H).

24) 5'-HO-T-P(OH)-T-P(OEthyl)<sub>2</sub>

10 mg (0.012 mMol) "5'-HO-T-P(ONPE)-T-P(OEt)<sub>2</sub>" (Beispiel 23) wurden in 1 ml einer 0.5M Lösung DBU in Pyridin gelöst und zunächst 24 h bei 4°C, dann 24h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum abgedampft, der Rückstand zweimal mit Pentan, dann zweimal mit Ether digeriert, dann wurde zur Reinigung über Kieselgel chromatographiert (EE/Methanol/TEA 9/1/0.2, dann 70/30/2, dann 60/40/2). Ausbeute: 10.2 mg.

MS (FAB): 725.3 (M + 2Na - H)<sup>+</sup>; 703.3 (M + Na)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, DMSO, TMS) Charakteristische Signale sind: Thymin-H: 7.15–7.70 (m, 2H); CO-CH<sub>2</sub>: 4.67–4.92 (m, 4H); Thymin-CH<sub>3</sub>: 1.67–1.81 (m, 6H).

25) 5'-MMTr-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(OEt)<sub>2</sub>

Die Synthese erfolgte analog Beispiel 17 aus "5'-HO-T-P(ONPE)-T-P(OEt)<sub>2</sub>" (Beispiel 22) und N-Thymin-1-yl-acetyl-N-(4-methoxytriphenylmethoxy)ethylaminomethanphosphonsäure-(4-nitrophenylethyl)monoester (Triethylammoniumsalz) (Beispiel 15) unter Zusatz von 1.5 eq (bezogen auf Beispiel 23) 4-Methoxypyridin-N-oxid. Zur Reinigung wurde über Kieselgel chromatographiert (EE/Methanol/TEA 90/10/2, dann 85/15/2). Ausbeute: 61%.

MS (ES +): 1555.8 (M + H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, DMSO, TMS) Charakteristische Signale sind: Ar-H & Thymin-H: 6.83–8.20 (m, 25H); CO-CH<sub>2</sub>: 4.52–4.75 (m, 6H); Thymin-CH<sub>3</sub>: 1.61–1.78 (m, 9H).

26) 5'-HO-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(OEt)<sub>2</sub>

Die Synthese erfolgte analog Beispiel 4 aus "5'-MMTr-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(OEt)<sub>2</sub>" (Beispiel 25). Zur Reinigung wurde über Kieselgel chromatographiert (EE/Methanol/TEA 70/30/2). Die Ausbeute betrug 89%.

MS (ES +): 1283.1 (M + H)<sup>+</sup>; 1305.0 (M + Na)<sup>+</sup>.

27) 5'-MMTr-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(OEt)<sub>2</sub>

Die Synthese erfolgte analog Beispiel 17 aus "5'-HO-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(OEt)<sub>2</sub>" (Beispiel 26) und N-Thymin-1-yl-acetyl-N-(4-methoxytriphenylmethoxy)ethylaminomethanphosphonsäure-(4-nitrophenylethyl)monoester (Triethylammoniumsalz) (Beispiel 15) unter Zusatz von 1.5 eq (bezogen auf Beispiel 23) 4-Methoxypyridin-N-oxid. Zur Reinigung wurde über Kieselgel chromatographiert (EE/Methanol/TEA 90/10/2, dann 80/20/2). Ausbeute: 15%.

MS (ES +): 2007 (M + H)<sup>+</sup>; 2029 (M + Na)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, DMSO, TMS) Charakteristische Signale sind: Ar-H & Thymin-H: 6.79–8.21 (m, 30 H); CO-CH<sub>2</sub>: 4.53–4.87 (m, 8H); Thymin-CH<sub>3</sub>: 1.58–1.89 (m, 12H).

28) 5'-HO-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(OEt)<sub>2</sub>

Die Synthese erfolgte analog Beispiel 4 aus "5'-MMTr-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(OEt)<sub>2</sub>" (Beispiel 27). Zur Reinigung wurde über Kieselgel chromatographiert (EE/Methanol/TEA 70/30/2). Die Ausbeute betrug 55%.

MS (FAB): 1735 (M + H)<sup>+</sup>; 1757 (M + Na)<sup>+</sup>.

29) 5'-MMTr-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)<sub>2</sub>

Die Synthese erfolgte analog Beispiel 17 aus N-Thymin-1-yl-acetyl-N-(2-hydroxyethyl)aminomethanphosphonsäuredi(4-nitrophenylethyl)ester (Beispiel 20) und N-Thymin-1-yl-acetyl-N-(4-methoxytriphenylmethoxy)ethylaminomethanphosphonsäure-(4-nitrophenylethyl)monoester (Triethylammoniumsalz) (Beispiel 15). Zur Reinigung wurde über Kieselgel chromatographiert (EE/Methanol/TEA 100/0/1, dann 90/10/1). Ausbeute: 87%.

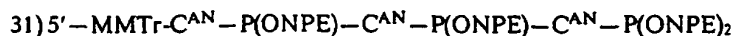
MS (FAB): 1356.2 (M + 2Li - H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, DMSO, TMS) Charakteristische Signale sind: Ar-H & Thymin-H: 6.82–8.18 (m, 28H); CO-CH<sub>2</sub>: 4.50–4.71 (m, 4H); Thymin-CH<sub>3</sub>: 1.59–1.78 (m, 6H).

30) 5'-HO-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)<sub>2</sub>

Die Synthese erfolgte analog Beispiel 4 aus "5'-MMTr-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)<sub>2</sub>" (Beispiel 29). Zur Reinigung wurde über Kieselgel chromatographiert (EE/Methanol/TEA 85/15/1, dann 80/20/1). Die Ausbeute betrug 78%.

MS (ES +): 1072.7 (M + H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, DMSO, TMS) Charakteristische Signale sind: Ar-H &

Thymin-H: 7.08–8.20 (m, 14H); CO–CH<sub>2</sub>: 4.52–4.80 (m, 4H); Thymin-CH<sub>3</sub>: 1.70 (s, breit, 6H).



Die Synthese erfolgte analog Beispiel 17 aus N-(N<sup>6</sup>-Anisoyl)cytosin-1-yl-acetyl-N-(4-methoxytriphenylmethoxy)ethylaminomethanphosphonsäure(2-(p-nitrophenyl)ethyl)monoester (Triethylammoniumsalz) (Beispiel 3) und "5'–HO–C<sup>AN</sup>–P(ONPE)–C<sup>AN</sup>–P(ONPE)<sub>2</sub>" (Beispiel 6). Zur Reinigung wurde über Kieselgel chromatographiert (EE/Methanol/TEA 80/19/1). Ausbeute: 66%.

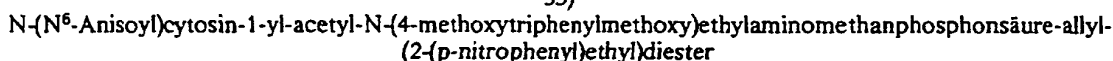
MS (FAB): 2155 (M+H)<sup>+</sup>; 2161 (M+Li)<sup>+</sup>; 2177 (M+Na)<sup>+</sup>.



Die Synthese erfolgte analog Beispiel IV aus "5'–MMTr–C<sup>AN</sup>–P(ONPE)–C<sup>AN</sup>–P(ONPE)–C<sup>AN</sup>–P(ONPE)<sub>2</sub>" (Beispiel 31). Zur Reinigung wurde über Kieselgel chromatographiert (EE/Methanol/TEA 85/15/1, dann 80/20/1). Die Ausbeute betrug 70%.

MS (FAB): 1882 (M+H)<sup>+</sup>; 1904 (M+Na)<sup>+</sup>.

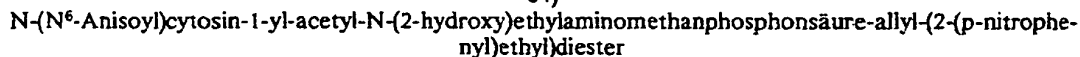
33)



Die Synthese erfolgte analog Beispiel 17 aus N-(N<sup>6</sup>-Anisoyl)cytosin-1-yl-acetyl-N-(4-methoxytriphenylmethoxy)ethylaminomethanphosphonsäure(2-(p-nitrophenyl)ethyl)monoester (Triethylammoniumsalz) (Beispiel 3) und Allylalkohol. Zur Reinigung wurde über Kieselgel chromatographiert (EE/Methanol/TEA 95/5/1).

MS (ES<sup>+</sup>): 902.1 (M+H)<sup>+</sup>; 924.1 (M+Na)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, DMSO, TMS): = 2.94–3.70 (m, 8H, P–O–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–Ar + MMTr–O–CH<sub>2</sub> + N–CH<sub>2</sub> + P–CH<sub>2</sub>); 3.75 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.86 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 4.10–4.60 (m, 4H, P–O–CH<sub>2</sub>); 4.79 & 4.84 (je s, breit, 2H, CO–CH<sub>2</sub>); 5.09–5.39 (m, 2H, H<sub>2</sub>C=CH–); 5.71–6.00 (m, 1H, H<sub>2</sub>C=CH–); 6.83–8.19 (m, 24H, Ar–H, Cytosinyl-H); 11.03 (s breit, 1H, NH).

34)

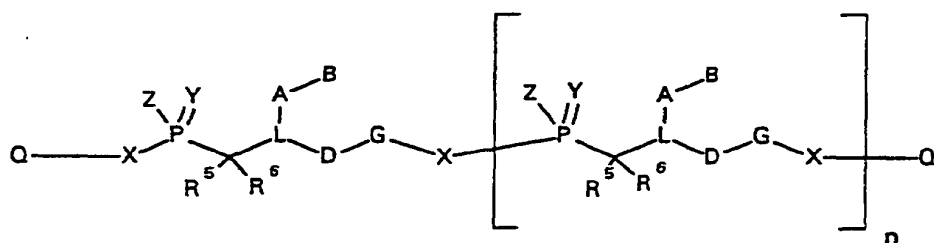


Die Synthese erfolgte analog Beispiel 4 aus N-(N<sup>6</sup>-Anisoyl)cytosin-1-yl-acetyl-N-(4-methoxytriphenylmethoxy)ethylaminomethanphosphonsäure-allyl-(2-(p-nitrophenyl)ethyl)diester (Beispiel 33). Zur Reinigung wurde über Kieselgel chromatographiert (EE/Methanol/TEA 94/5/1). Die Ausbeute betrug 83%.

MS (ES<sup>+</sup>): 630.2 (M+H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, DMSO, TMS): = 3.02 (t, 2H, P–O–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–Ar); 3.37–3.72 (m, 4H, HO–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>); 3.86 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.91 (d, J = 11 Hz, 2H, P–CH<sub>2</sub>); 4.22 (dt, 2H, P–O–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–Ar); 4.40 (dd, 2H, O–CH<sub>2</sub>–CH=CH<sub>2</sub>); 4.78 & 5.01 (m, 2H, CO–CH<sub>2</sub>); 5.11–5.33 (m, 2H, H<sub>2</sub>C=CH–); 5.71–6.00 (m, 1H, H<sub>2</sub>C=CH–); 6.99–8.21 (m, 14H, Ar–H, Cytosinyl-H); 11.03 (s breit, 1H, NH).

## Patentansprüche

### 1. Verbindungen der Formel I



(I)

worin

n eine Zahl von Null bis 100 bedeutet;

B unabhängig voneinander Wasserstoff, Hydroxy, (C<sub>1</sub>–C<sub>20</sub>)-Alkyl, (C<sub>1</sub>–C<sub>20</sub>)-Alkoxy, (C<sub>1</sub>–C<sub>20</sub>)-Alkylthio, (C<sub>6</sub>–C<sub>20</sub>)-Aryl, (C<sub>6</sub>–C<sub>20</sub>)-Aryl-(C<sub>1</sub>–C<sub>6</sub>)-alkyl, (C<sub>6</sub>–C<sub>20</sub>)-Aryl-(C<sub>1</sub>–C<sub>6</sub>)-alkoxy, (C<sub>6</sub>–C<sub>20</sub>)-Aryl-(C<sub>1</sub>–C<sub>6</sub>)-alkylthio, eine aromatische Gruppe oder eine heterocyclische Gruppe bedeutet, wobei Alkyl, Aryl und/oder die aromatische oder heterocyclische Gruppe gegebenenfalls ein oder mehrfach durch Hydroxy, (C<sub>1</sub>–C<sub>4</sub>)-Alkoxy, –NR<sup>9</sup>R<sup>10</sup>, –C(O)OH, Oxo, –C(O)OR<sup>8</sup>, –C(O)NR<sup>9</sup>R<sup>10</sup>, –CN, –F, –Cl, –Br, –NO<sub>2</sub>, (C<sub>2</sub>–C<sub>6</sub>)-Alkoxyalkyl, –S(O)<sub>m</sub>R<sup>8</sup>, –(C<sub>1</sub>–C<sub>6</sub>)-Alkyl-S(O)<sub>m</sub>R<sup>8</sup>, –NHC(=NH)NHR<sup>8</sup>, –C(=NH)NHR<sup>8</sup>, –NR<sup>9</sup>C(=O)R<sup>8</sup>, –NOR<sup>8</sup>, NR<sup>9</sup>C(=O)OR<sup>10</sup>, –OC(=O)NR<sup>9</sup>R<sup>10</sup> und –NR<sup>9</sup>C(=O)NR<sup>9</sup>R<sup>10</sup> substituiert sein

können, oder

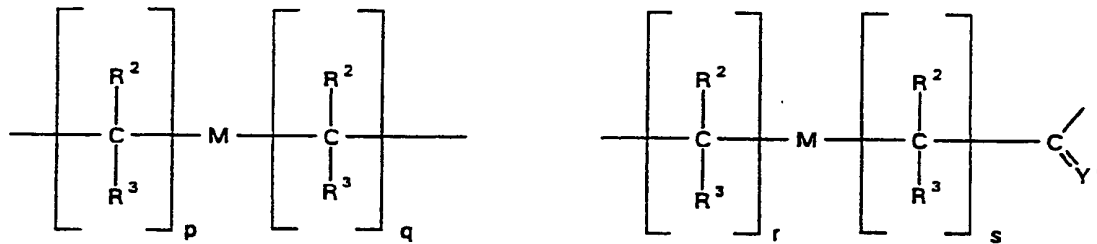
B für eine natürliche Nucleobasen, eine unnatürliche Nucleobase oder einen Reporter Liganden steht;

A — B kann auch für eine über die Carboxylgruppe aufkondensierte D- oder L-Aminosäure oder für Peptide bestehend aus diesen Aminosäuren mit bis zu einer Länge von 5 Aminosäureresten stehen, L unabhängig

voneinander N oder  $R^1N^+$ , und

$R^1$  für Wasserstoff oder  $(C_1-C_6)$ -Alkyl steht, das mit Hydroxy,  $(C_1-C_6)$ -Alkoxy,  $(C_1-C_6)$ -Alkylthio oder Amino substituiert sein kann, bevorzugt Wasserstoff oder Methyl bedeutet;

A unabhängig voneinander eine Einfachbindung, eine Methylengruppe oder eine Gruppe der Formel IIa oder IIb bedeutet;



(IIa)

(IIb)

$Y'$  für  $=O$ ,  $=S$ ,  $=CH_2$ ,  $=C(CH_3)_2$  oder  $=N^+R^1$  steht, wobei  $R^1$  wie oben definiert ist;

M für eine Einfachbindung,  $-O-$ ,  $-S-$  oder  $-N^+R^1-$  steht, wobei  $R^1$  wie oben definiert ist;

$R^2$  und  $R^3$  unabhängig voneinander für Wasserstoff, Hydroxy,  $(C_1-C_6)$ -Alkoxy,  $(C_1-C_6)$ -Alkylthio, Amino, Halogen, wie F, Cl, Br oder  $(C_1-C_6)$ -Alkyl steht, welches gegebenenfalls mit Hydroxy,  $(C_1-C_6)$ -Alkoxy oder  $(C_1-C_6)$ -Alkylthio substituiert sein kann;

p und q unabhängig voneinander für Null bis 5 stehen;

r und s unabhängig voneinander für Null bis 5 stehen;

D und G für  $CR^5R^6$  stehen;

$R^5$  und  $R^6$  unabhängig voneinander Wasserstoff,  $(C_1-C_6)$ -Alkyl,  $(C_6-C_{20})$ -Aryl,  $(C_6-C_{20})$ -Aryl- $(C_1-C_6)$ -alkyl, Hydroxy,  $(C_1-C_6)$ -Alkoxy,  $(C_1-C_6)$ -Alkylthio bedeuten, und Alkyl und Aryl gegebenenfalls mit  $SR^1$  oder  $NR^1R^1$ , substituiert sein kann, wobei  $R^1$  wie oben definiert ist und  $R^1$  unabhängig von  $R^1$  die gleiche Bedeutung wie  $R^1$  hat;

X für  $-O-$ ,  $-S-$  oder  $-N^+R^1-$ , worin  $R^1$  wie oben definiert ist, steht;

Y für  $=O$  oder  $=S$  steht;

Z für  $-OR^8$ ,  $-NR^9R^{10}$  steht;

$R^8$  Wasserstoff,  $(C_1-C_{18})$ -Alkyl,  $(C_2-C_{18})$ -Alkenyl,  $(C_3-C_{18})$ -Alkinyl,  $(C_6-C_{12})$ -Aryl,  $(C_6-C_{12})$ -Aryl- $(C_1-C_6)$ -alkyl bedeutet, wobei Alkyl ein oder mehrfach mit Hydroxy,  $(C_1-C_4)$ -Alkoxy, F, Cl, Br substituiert sein kann und Aryl 1-3fach mit Hydroxy,  $(C_1-C_4)$ -Alkoxy,  $(C_1-C_4)$ -Alkyl, F, Cl, Br,  $NO_2$ ,  $-NR^9R^{10}$ ,  $-C(O)OH$ ,  $-C(O)O-(C_1-C_6)$ -Alkyl,  $-C(O)NR^9R^{10}$ , substituiert sein kann, bevorzugt jedoch für Wasserstoff,  $(C_1-C_6)$ -Alkyl,  $(C_6-C_{12})$ -Aryl oder  $(C_6-C_{12})$ -Aryl- $(C_1-C_6)$ -alkyl steht, wobei Aryl einfach mit  $(C_1-C_4)$ -Alkoxy,  $(C_1-C_4)$ -Alkyl, F, Cl, Br,  $NO_2$ , substituiert sein kann, besonders bevorzugt Wasserstoff,  $(C_1-C_6)$ -Alkyl, Phenyl oder 2-(4-Nitrophenyl)ethyl bedeutet;

$R^9$  und  $R^{10}$  unabhängig voneinander für Wasserstoff,  $(C_1-C_{18})$ -Alkyl,  $(C_1-C_{18})$ -Alkenyl,  $(C_1-C_{18})$ -Alkinyl,  $(C_6-C_{12})$ -Aryl,  $(C_6-C_{12})$ -Aryl- $(C_1-C_6)$ -alkyl stehen, wobei Alkyl ein oder mehrfach mit Hydroxy,  $(C_1-C_4)$ -Alkoxy, F, Cl, Br substituiert sein kann, oder  $R^9$  und  $R^{10}$  können zusammen mit dem sie tragenden N-Atom einen 4-7gliedrigen Ring bilden;

Q und Q' unabhängig voneinander Wasserstoff bedeuten, für Konjugate stehen, welche die Eigenschaften von Antisense-Oligonucleotiden oder von Tripelhelix bildenden Oligonucleotiden günstig beeinflussen oder als Markierung einer DNA Sonde dienen oder bei der Hybridisierung des Oligonucleotidanalogons an die Target-Nucleinsäure diese unter Bindung oder Quervernetzung angreift, oder Oligonucleotide bedeuten, die unmodifiziert oder modifiziert sein können.

2. Verbindungen der Formel I gemäß Anspruch 1, worin

n eine Zahl von Null bis 50 bedeutet;

B unabhängig voneinander für eine natürliche Nucleobase oder eine unnatürliche Nucleobase steht;

L N bedeutet;

A eine Gruppe der Formel IIb bedeutet, worin  $r = 1$  und s Null, und  $R^2$ ,  $R^3 = H$  und  $Y' = O$  und M eine Einfachbindung bedeuten;

D und G  $CHR^5$  bedeuten;

$R^5$  für Wasserstoff steht;

X  $-O-$  bedeutet;

Y  $=O$  bedeutet;

Z für Hydroxy, Methoxy, Ethoxy, (4-Nitrophenol)ethoxy, Propoxy, iso-Propoxy, Butoxy, Pentoxy, Phenoxy oder Allyloxy steht;

Q und Q' unabhängig voneinander für Oligonucleotide stehen, die unmodifiziert

und modifiziert sein können, wobei

- a) die 3'- und/oder 5'-Phosphorsäurediesterbrücken vollständig oder teilweise durch Phosphorothioat-, Phosphorodithioat-, NR<sup>4</sup>R<sup>4'</sup>-Phosphoramidat-, Phosphat-O-Methylester-, Phosphat-O-ethylester-, Phosphat-O-isopropylester-, Methylphosphonat- oder Phenylphosphonat-Brücken ersetzt sind;
- b) ein, zwei oder drei 3'- oder 5-Phosphorsäurediesterbrücken an den Pyrimidin-Positionen und am 5'-Ende und/oder am 3'-Ende durch Formacetale und/oder 3'-Thioformacetale ersetzt sind;
- c) das Zuckerphosphat-Rückgrats vollständiger oder teilweise durch "PNAs" oder PNA-DNA-Hybride ersetzt ist;
- d) die  $\beta$ -D-2'-Desoxyriboseeinheiten vollständig oder teilweise durch 2'-F-2'-Desoxyribose, 2'-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)Alkyl-Ribose, 2'-O-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)Alkenyl-Ribose, 2'-NH<sub>2</sub>-2'-desoxyribose ersetzt sind;
- e) die natürlichen Nucleosid-Basen vollständig oder teilweise durch 5-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)Alkyl-uracil, 5-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)Alkenyl-uracil, 5-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)Alkyl-uracil, 5-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)Alkyl-cytosin, 5-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)Alkenyl-cytosin, 5-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)Alkyl-cytosin, 5-Fluoruracil, 5-Fluorcytosin, 5-Chloruracil, 5-Chlorcytosin, 5-Bromuracil, 5-Bromcytosin, 7-Deaza-7-(C<sub>2</sub>-C<sub>7</sub>)alkinylguanin, 7-Deaza-7-(C<sub>2</sub>-C<sub>7</sub>)alkinyladenin, 7-Deaza-7-(C<sub>2</sub>-C<sub>7</sub>)alkenylguanin, 7-Deaza-7-(C<sub>2</sub>-C<sub>7</sub>)alkenyladenin, 7-Deaza-7-(C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>)alkylguanin, 7-Deaza-7-(C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>)alkyladenin, 7-Deaza-7-bromguanin, 7-Deaza-7-bromadenin ersetzt sind.

3. Verbindungen der Formel I gemäß den Ansprüchen 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß n eine Zahl von 1 bis 30 bedeutet;

Q und Q' unabhängig voneinander für Oligonucleotide stehen, die unmodifiziert und modifiziert sein können, wobei

- a) die 3'- und/oder 5'-Phosphorsäurediesterbrücken vollständig oder teilweise durch Phosphorothioat-, Phosphorodithioat- oder Methylphosphonat-Brücken ersetzt sind;
- b) ein, zwei oder drei 3'- oder 5-Phosphorsäurediesterbrücken am 5'- und am 3'-Ende ersetzt sind;
- c) das Zuckerphosphat-Rückgrats vollständiger oder teilweise durch "PNAs" oder PNA-DNA-Hybride ersetzt ist;
- d) die  $\beta$ -D-2'-Desoxyriboseeinheiten vollständig oder teilweise durch 2'-F-2'-Desoxyribose, 2'-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)Alkyl-Ribose, 2'-O-(C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)Alkenyl-Ribose, 2'-NH<sub>2</sub>-2'-desoxyribose ersetzt sind;
- e) die natürlichen Nucleosid-Basen vollständig oder teilweise durch 5-(C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)Alkyl-uracil, 5-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)Alkenyl-uracil, 5-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)Alkyl-uracil, 5-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)Alkyl-cytosin, 5-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)Alkenyl-cytosin, 5-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)Alkyl-cytosin, 7-Deaza-7-(C<sub>2</sub>-C<sub>7</sub>)alkinylguanin, 7-Deaza-7-(C<sub>2</sub>-C<sub>7</sub>)alkinyladenin, 7-Deaza-7-(C<sub>2</sub>-C<sub>7</sub>)alkenylguanin, 7-Deaza-7-(C<sub>2</sub>-C<sub>7</sub>)alkenyladenin, 7-Deaza-7-(C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>)alkylguanin, 7-Deaza-7-(C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>)alkyladenin, 7-Deaza-7-bromguanin, 7-Deaza-7-bromadenin ersetzt sind.

4. Verbindungen der Formel I gemäß den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß n eine Zahl von 1 bis 30 bedeutet;

B unabhängig voneinander für eine natürliche Nucleobase steht;

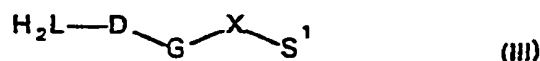
Z für Hydroxy, Ethoxy, (4-Nitrophenyl)ethoxy oder Phenoxy steht;

Q und Q' unabhängig voneinander für Oligonucleotide stehen, die unmodifiziert und modifiziert sein können, wobei

- a) die 3'- und/oder 5'-Phosphorsäurediesterbrücken vollständig oder teilweise durch Phosphorothioat-Brücken ersetzt sind;
- c) das Zuckerphosphat-Rückgrats vollständiger oder teilweise durch "PNAs" oder PNA-DNA-Hybride ersetzt ist;
- d) die  $\beta$ -D-2'-Desoxyriboseeinheiten vollständig oder teilweise durch 2'-O-Methyl-, 2'-O-Allyl-, 2'-O-Butyribose ersetzt sind;
- e) die natürlichen Nucleosid-Basen vollständig oder teilweise durch 5-Hexinylcytosin, 5-Hexinyluracil, 5-Hexinylcytosin, -Deaza-7-propinylguanin, 7-Deaza-7-propinyladenin, 7-Deaza-7-methylguanin, 7-Deaza-7-methyladenin, 7-Deaza-7-propinyladenin, 7-Deaza-7-bromguanin, 7-Deaza-7-bromadenin ersetzt sind.

5. Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der Formel I, dadurch gekennzeichnet, daß man

- a) Verbindungen der Formel III

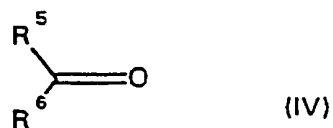


worin

D, G, L und X oben genannte Bedeutungen haben und

S<sup>1</sup> für eine geeignete Schutzgruppe steht, wie beispielsweise Dimethoxytrityl, Monomethoxytrityl, Trityl oder Pixyl, bevorzugt Monomethoxytrityl,

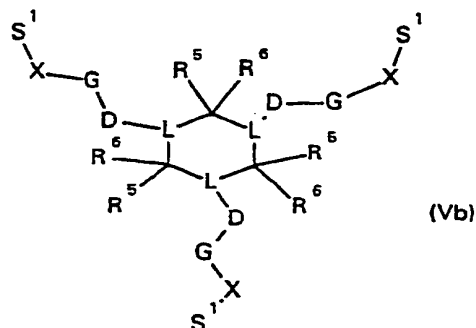
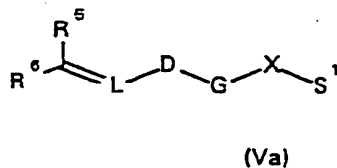
mit Verbindungen der Formel IV



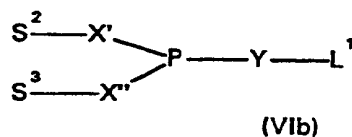
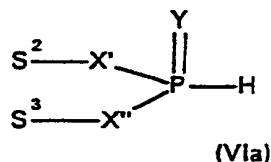
worin

$R^5$  und  $R^6$  oben genannte Bedeutungen haben,

in einem geeigneten organischen Lösungsmittel, bei Temperaturen von  $0^\circ\text{C}$  bis  $100^\circ\text{C}$ , umgesetzt zu Verbindungen der Formel Va oder Vb



b<sub>1</sub>) Verbindungen der Formel Va oder Vb mit Verbindungen der Formel VIa oder VIb



worin

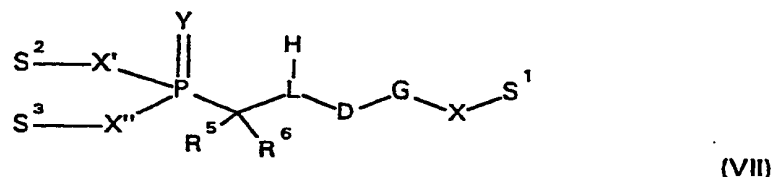
Y wie oben definiert ist,

$X'$  und  $X''$  unabhängig voneinander wie X definiert sind,

$S^2$  und  $S^3$  unabhängig voneinander Schutzgruppen bedeuten, und

$L^1$  für eine Abgangsgruppe, vorzugsweise für  $(C_1 - C_4)$ -Alkyl, steht,

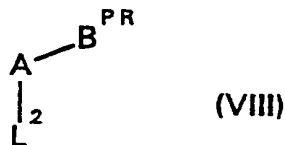
in einem geeigneten organischen Lösungsmittel, bei Temperaturen von  $0^\circ\text{C}$  bis  $100^\circ\text{C}$ , gegebenenfalls unter Zusatz von Basen, komplexen Basen oder ungeladenen, peralkylierten Polyamino-Phosphazenen-Basen umgesetzt zu Verbindungen der Formel VII



worin

D, G, L,  $R^5$ ,  $R^6$ ,  $S^1$ ,  $S^2$ ,  $S^3$ , X,  $X'$ ,  $X''$  und Y wie oben definiert sind;

c<sub>1</sub>) Verbindungen der Formel VII mit Verbindungen der Formel VIII,



worin

A die oben genannte Bedeutung hat,

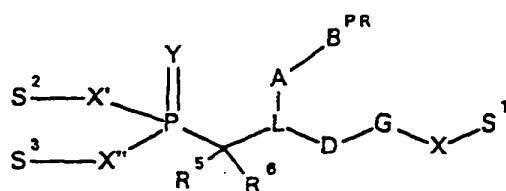
$B^{PR}$  die gleiche Bedeutung wie B hat, gegebenenfalls jedoch in geschützter Form vorliegt, und

$L^2$  für eine dem Fachmann bekannte Abgangsgruppe steht oder, falls A die

Bedeutung von Formel IIb hat auch für OH stehen kann;

in einem geeigneten organischen Lösungsmittel, bei Temperaturen von  $-20^\circ\text{C}$  bis  $100^\circ\text{C}$ , gegebenenfalls unter Zusatz von Basen, komplexen Basen oder ungeladenen, peralkylierten Polyamino-Phosphazenen-Basen oder ohne Basenzusatz und unter Zusatz eines zur Knüpfung von Peptid-Bindungen üblichen Kopplungsreagenzes, umgesetzt zu Verbindungen der Formel IX



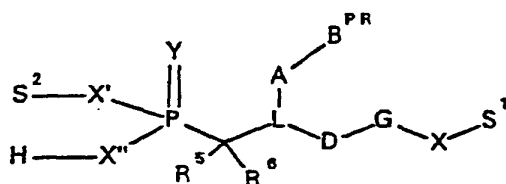


(IX)

worin

A, B<sup>PR</sup>, D, G, L, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, S<sup>1</sup>, S<sup>2</sup>, S<sup>3</sup>, X, X', X'' und Y wie oben definiert sind;

d<sub>1</sub>) aus Verbindungen der Formel IX die Schutzgruppe S<sup>3</sup> nach bekannten Verfahren abspaltet, wobei man Verbindungen der Formel X erhält

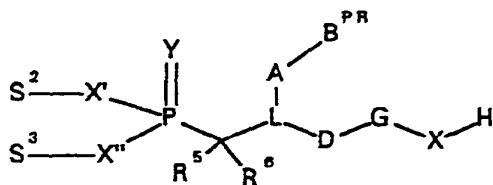


(X)

worin

A, B<sup>PR</sup>, D, G, L, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, S<sup>1</sup>, S<sup>2</sup>, X, X', X'' und Y wie oben definiert sind;

e<sub>1</sub>) aus Verbindungen der Formel IX die Schutzgruppe S<sup>1</sup> nach bekannten Verfahren, wobei man Verbindungen der Formel XI erhält

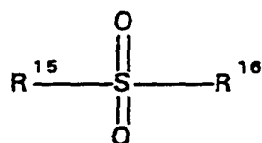


(XI)

worin

A, B<sup>PR</sup>, D, G, L, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, S<sup>2</sup>, S<sup>3</sup>, X, X', X'' und Y wie oben definiert sind;

f<sub>1</sub>) Verbindungen der Formel XI mit Verbindungen der Formel X gemäß dem aus der Oligonucleotid-Chemie bekannten "Phosphotriester-Verfahren" in einem geeigneten organischen Lösungsmittel, bei Temperaturen von -20°C bis 100°C, unter Zusatz eines Kopplungsreagenzes oder einer Verbindung der Formel XII



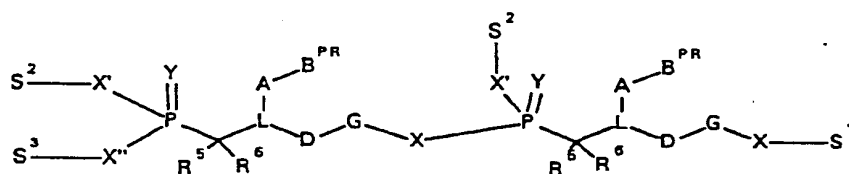
(XII)

worin

R<sup>15</sup> für (C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>)-Aryl, gegebenenfalls ein bis vierfach substituiert durch (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkyl, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkoxy, Nitro, Chlor, Brom und wobei gegebenenfalls ein bis 3 C-Atome durch Heteroatome substituiert sind, und

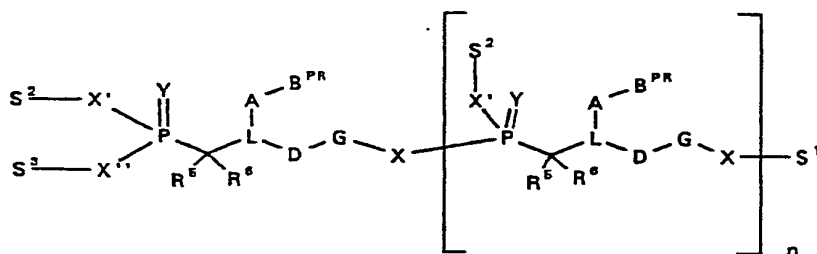
R<sup>16</sup> für eine Abgangsgruppe steht,

gegebenenfalls unter Zusatz eines Katalysators, wobei die Herstellung der Kopplungsreagenzien in situ erfolgen kann, oder aber separat erfolgen und die Lösung der aktivierten Spezies in einem geeigneten Lösungsmittel zugegeben werden kann, zu Verbindungen der Formel XIII umsetzt,



(XIII)

worin

A, B<sup>PR</sup>, D, G, L, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, S<sup>1</sup>, S<sup>2</sup>, S<sup>3</sup>, X, X', X'' und Y wie oben definiert sind;g<sub>1</sub>) ausgehend von Verbindungen der Formel XIII die Schritte e<sub>1</sub>) und f<sub>1</sub>) bis zur gewünschten Kettenlänge wiederholt wobei Verbindungen der Formel XIV resultieren,

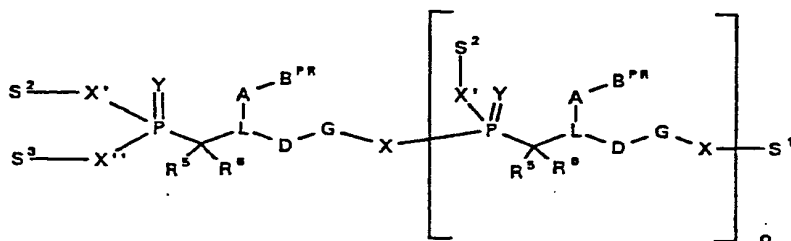
(XIV)

worin

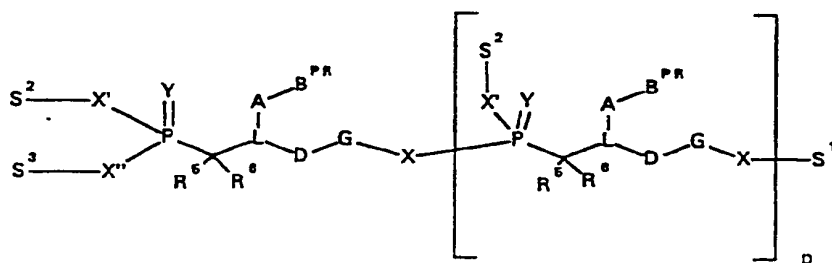
A, B<sup>PR</sup>, D, G, L, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, S<sup>1</sup>, S<sup>2</sup>, S<sup>3</sup>, X, X', X'', Y und n wie oben definiert sind;h<sub>1</sub>) die Schutzgruppen S<sup>1</sup>, S<sup>2</sup>, und S<sup>3</sup> und die Schutzgruppen an B<sup>PR</sup> nach bekannten Verfahren abspaltet;

und gegebenenfalls die Gruppen Q und Q' nach dem Fachmann bekannten Verfahren einführt, und gegebenenfalls die erhaltenen Verbindungen cyclisiert, wodurch Verbindungen der Formel I resultieren.

6. Verfahren zur Herstellung der Verbindungen der Formel I gemäß den Ansprüchen 1 bis 4, worin n 1 bis 100 bedeutet, dadurch gekennzeichnet ist, daß man in den Verbindungen der Formeln XV und XVI



(XV)



(XVI)

worin

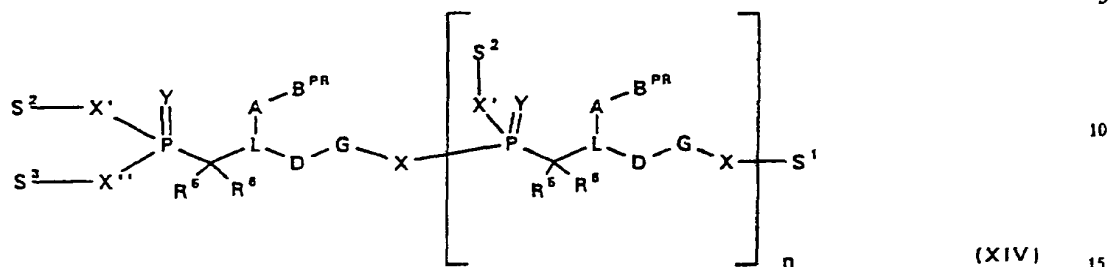
A, B<sup>PR</sup>, D, G, L, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, S<sup>1</sup>, S<sup>2</sup>, S<sup>3</sup>, X, X', X'' und Y wie oben definiert sind,

o und p unabhängig voneinander Null bis 50 und

o + p + 1 = n bedeuten;

a<sub>2</sub>) in den Verbindungen der Formel XV die Schutzgruppe S<sup>1</sup> wie unter e<sub>1</sub>) beschrieben abspaltet,

b<sub>2</sub>) in den Verbindungen der Formel XVI die Schutzgruppe S<sup>3</sup> wie unter d<sub>1</sub>) beschrieben abspaltet und  
 c<sub>2</sub>) die entstehenden Verbindungen wie unter f<sub>1</sub>) beschrieben miteinander koppelt, wobei Verbindungen der Formel XIV resultieren,



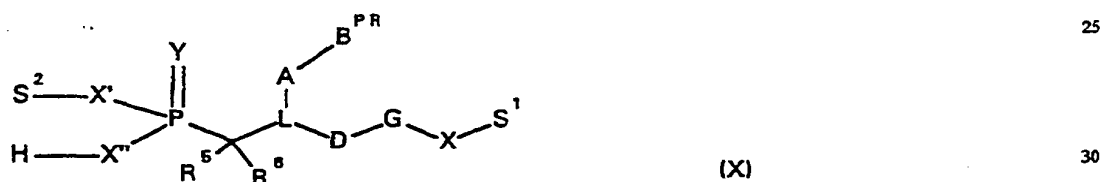
worin

A, B<sup>PR</sup>, D, G, L, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, S<sup>1</sup>, S<sup>2</sup>, S<sup>3</sup>, X, X', X'', Y und n wie oben definiert sind,

d<sub>2</sub>) und diese wie unter h<sub>1</sub>) beschrieben zu Verbindungen der Formel I umsetzt.

7. Verfahren zur Herstellung der Verbindungen der Formel I gemäß den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß man

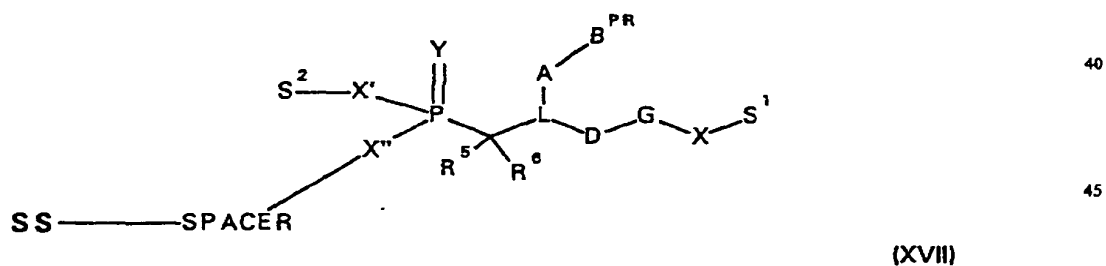
a<sub>3</sub>) Verbindungen der Formel X,



worin

A, B<sup>PR</sup>, D, G, L, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, S<sup>1</sup>, S<sup>2</sup>, X, X', X'' und Y wie oben definiert sind,

nach bekannten Verfahren über einen SPACER an einen festen Träger koppelt, zu Verbindungen der Formel XVII,



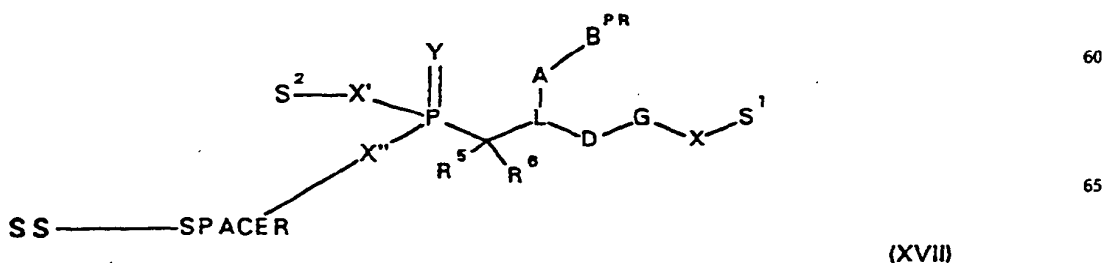
worin

A, B<sup>PR</sup>, D, G, L, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, S<sup>1</sup>, S<sup>2</sup>, X, X', X'' und Y wie oben definiert sind,

SS für einen zur Festphasensynthese geeigneten festen Träger steht, und

SPACER für eine vom Träger nach erfolgter Synthese abspaltbare Gruppe steht, wie sie dem Fachmann bekannt sind, oder SPACER für bisfunktionelle Konjugatmoleküle Q, die über bekannte abspaltbare Gruppen an den festen Träger geknüpft werden, steht;

b<sub>3</sub>) aus Verbindungen der Formel XVII,



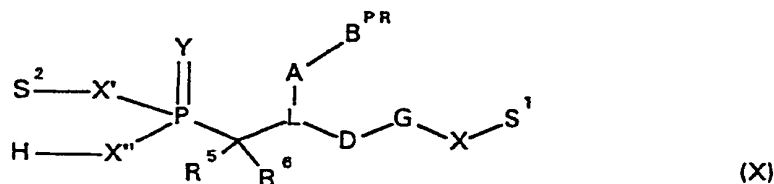
worin

A, B<sup>PR</sup>, D, G, L, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, S<sup>1</sup>, S<sup>2</sup>, SS, SPACER, X, X', X'' und Y wie oben definiert sind, die Schutzgruppe S<sup>1</sup> wie unter e<sub>1</sub>) beschrieben abspaltet;

c<sub>3</sub>) die resultierende Verbindung mit Verbindungen der Formel X,

5

10



15

worin

A, B<sup>PR</sup>, D, G, L, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, S<sup>1</sup>, S<sup>2</sup>, X', X'' und Y wie oben definiert sind, wie unter f<sub>1</sub>) beschrieben umgesetzt;

d<sub>3</sub>) die Schritte b<sub>3</sub>) und c<sub>3</sub>) bis zur gewünschten Kettenlänge wiederholt;

e<sub>3</sub>) gegebenenfalls Konjugate Q' durch bekannte Verfahren aufkoppelt;

20

f<sub>3</sub>) die so erzeugten Verbindungen nach bekannten Verfahren vom festen Träger abspaltet, und die Schutzgruppen wie in Schritt h<sub>1</sub>) beschrieben, wobei die Abspaltung der Schutzgruppen auch vor der Spaltung vom Träger erfolgen kann.

8. Verwendung der Verbindungen der Formel I gemäß den Ansprüchen 1 bis 4 als Inhibitoren der Genexpression.

25

9. Verwendung der Verbindungen der Formel I gemäß den Ansprüchen 1 bis 4 als Diagnostikum, zur Behandlung von Erkrankungen, die durch Viren hervorgerufen, durch Integrine oder Zell-Zell-Adhäsionsrezeptoren beeinflusst oder durch Faktoren wie TNF alpha ausgelöst werden, zur Behandlung von Krebs oder der Restenose.

30

35

40

45

50

55

60

65